

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JULIO MESQUITA FILHO”  
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS  
CÂMPUS DE JABOTICABAL

**AVALIAÇÃO MICROBIOLÓGICA DE QUEIJOS TIPO  
MINAS FRESCAL COMERCIALIZADOS NA REGIÃO DO  
TRIÂNGULO MINEIRO**

Mônica Hitomi Okura  
Engenheira de alimentos

JABOTICABAL – SÃO PAULO – BRASIL  
2010

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JULIO MESQUITA FILHO”

FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS

CAMPUS DE JABOTICABAL

**AVALIAÇÃO MICROBIOLÓGICA DE QUEIJOS TIPO  
MINAS FRESCAL COMERCIALIZADOS NA REGIÃO DO  
TRIÂNGULO MINEIRO**

Mônica Hitomi Okura

Orientador: Prof. Dr. José Moacir Marin

Tese apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp, Câmpus de Jaboticabal, como parte das exigências para a obtenção do título de Doutor em Microbiologia (Microbiologia Agropecuária).

JABOTICABAL – SÃO PAULO – BRASIL

Setembro de 2010

O41a Okura, Mônica Hitomi  
Avaliação microbiológica de queijos tipo Minas Frescal comercializados na região do Triângulo Mineiro / Mônica Hitomi Okura. – – Jaboticabal, 2010  
xxil, 128 f. ; 28 cm

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2010

Orientador: José Moacir Marin

Banca examinadora: Marcelo Henrique Napimoga, Patrícia Amoroso, Evelon Cid Rigobelo e Roberto Alves de Oliveira.

Bibliografia

1. *Enterobacteriaceae* 2. Leite 3. Antimicrobianos. 4. Especiarias  
. I. Título. II. Jaboticabal - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias.

CDU 576.8:637.652

Ficha catalográfica elaborada pela Seção Técnica de Aquisição e Tratamento da Informação – Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação - UNESP, Câmpus de Jaboticabal.

## **DADOS CURRICULARES DO AUTOR**

**MÔNICA HITOMI OKURA** - nasce no dia 02 de junho de 1967, na cidade de Mogi das Cruzes, SP. Inicia o curso de graduação em Engenharia de Alimentos na Universidade Federal de Viçosa, em 1989. Em 2000, inicia o curso de Mestrado no Programa de Microbiologia na Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias (FCAV – Campus de Jaboticabal) e, em 2007, o curso de Doutorado na mesma instituição, no entanto agora com o Programa intitulado Microbiologia Agropecuária. Inicia sua carreira em 2000, na Universidade de Uberaba, MG como professora de microbiologia no curso de Biomedicina, e atualmente ministra curso de microbiologia para os cursos de Farmácia Industrial, Odontologia, Biomedicina, Engenharia Ambiental e Sucroalcooleiro. Ministra microbiologia para o curso de Medicina e Microbiologia básica, Microbiologia de Alimentos e Biotecnologia no curso de Engenharia de Alimentos nas Faculdades Associadas de Uberaba. Ministra curso de pós-graduação em Microbiologia nas disciplinas de Micologia Básica e Microbiologia de Alimentos, na Universidade de Uberaba. Atualmente, participa do grupo de Pesquisa Desenvolvimento Farmacêutico do curso de Farmácia da Universidade de Uberaba e como pesquisadora na empresa Ondatec Tecnologia em micro-ondas de Uberaba desde 2007 até a presente data. É contratada recentemente como professor-pesquisador da empresa Innovare. Também trabalha como consultora do SEBRAE de Minas Gerais na área de Controle de Qualidade, Higiene e Segurança Alimentar. Em junho de 2010, é aprovada em concurso público para a vaga de professor adjunto lotada na Universidade Federal do Triângulo Mineiro, em Uberaba (UFTM), MG.

*A cada dia Deus nos dá uma tela nova,  
quem escolhe as cores somos nós"*

*Frei Clemente Kesselmeier*

## **AGRADECIMENTO**

A Deus, sempre presente na minha vida me fazendo ver sua infinita magnitude, me dando força, coragem e saúde para nunca desistir dos meus sonhos.

Às minhas duas princesas Hikari e Sayuri (filhas maravilhosas), por todo carinho, amor e principalmente paciência por sempre compreenderem a minha correria.

Ao meu esposo e grande amor Zito que me apoiou incondicionalmente em todas as etapas da minha vida não sendo diferente nesta, demonstrando sua paciência nos meus piores momentos, me dando carinho e principalmente seu amor. Amo-te muito, muito obrigada por mais este momento.

À minha família, meus pais Hiroharu e Termi Okura, que mesmo morando distante sempre me incentivaram e me apoiaram.

Ao meu orientador prof. José Moacir Marin, cuja orientação se estendeu além do doutorado com conselhos que vou carregar pela vida toda, pela oportunidade e paciência principalmente nessa reta final.

Aos professores Fernando Antônio Ávila, Ruben Pablo Schocken-Iturrino, Jaime Maia dos Santos, Janete Aparecida Desidário Sena pela convivência, carinho e preocupação.

Obrigada aos demais professores e a todos os outros envolvidos, mesmo indiretamente, mas indispensáveis à realização deste trabalho.

A todos os amigos, e em especial, a Dulândula, ao Marcelo, ao Benito, à Edilaine, ao Flávio, ao Zé Mauro, ao Rende, à Thaís, ao Carlos, à Hilara, à Tânia e à Camilla pela verdadeira amizade que tem dedicado a mim e à minha família, o que nos dá forças e faz acreditar que sempre seremos capazes de grandes conquistas, quando contamos com o companheirismo e apoio de grandes amigos.

Aos demais colegas que, pela ajuda e amizades que contribuíram para a realização deste trabalho, minha sincera gratidão.

## SUMÁRIO

<b>Conteúdo</b>	<b>pág.</b>
LISTA DE ABREVIATURAS.....	xi
LISTA DE TABELAS .....	xii
LISTA DE FIGURAS .....	xv
RESUMO .....	xvii
ABSTRACT - .....	xviii
I INTRODUÇÃO .....	1
II OBJETIVOS .....	5
III REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....	6
3.1 Importância do queijo .....	6
3.2 Queijo .....	7
3.3 Coliformes e <i>Escherichia coli</i> .....	9
3.4 <i>Escherichia coli</i> comensal .....	12
3.5. <i>Escherichia coli</i> patogênica extra-intestinal (ExPEC).....	12
3.6 <i>Escherichia coli</i> patogênicas intestinal .....	14
3.6.1 <i>E. coli</i> enteropatogênica (EPEC).....	14
3.6.2 <i>E. coli</i> enterotoxigênica (ETEC) .....	16
3.6.3 <i>E. coli</i> enteroinvasiva (EIEC).....	17
3.6.4 <i>E. coli</i> enterohemorrágica (EHEC) .....	17
3.6.5 <i>E. coli</i> enteroagregativa (EAEC ou EaggEC) .....	19
3.6.6 <i>E. coli</i> difusa aderente (DAEC) .....	19
3.7 Ocorrência de diferentes sorovares de <i>E. coli</i> em alimentos .....	19



3.8 Susceptibilidade a antimicrobianos .....	20
3.9 Quimioterápicos / Antibióticos .....	21
3.9.1 Classe Beta-lactâmicos .....	21
3.9.2 Classe Aminoglicosídeos .....	23
3.9.3 Classe Tetraciclina .....	24
3.9.4. Classe Quinolonas .....	25
3.10 Resistência.....	26
3.11 Atividade antimicrobiana de condimentos .....	28
3.12 Especiarias.....	30
3.12.1 <i>Origanum vulgare</i> L. (orégano) .....	31
3.12.2 <i>Petroselinum sativum</i> L (salsinha).....	34
IV MATERIAL E MÉTODOS .....	35
4.1 Obtenção de amostras .....	35
4.2 Preparo das amostras .....	35
4.3 Análises Microbiológicas .....	36
4.3.1 Técnica de Tubos Múltiplos.....	36
4.3.2 Identificação bioquímica das <i>Enterobacteriaceae</i> .....	36
4.4 Técnica de aglutinação em lâmina .....	37
4.5 Extração de DNA Template.....	37
4.6 Determinação do Gene de Virulência ( <i>stx1</i> , <i>stx2</i> e <i>eae</i> ) .....	38
4.7 Amplificação dos operons fimbriais ( <i>pap</i> , <i>afa</i> , <i>sfa</i> ) .....	39
4.8 Amplificação através da Técnica PCR .....	40
4.9 Teste de Suscetibilidade a Antimicrobianos .....	41
4.10 Antimicrobianos testados .....	42
4.11 Produção de queijos Tipo Minas Frescal .....	42
4.12 Fluxograma do queijo Tipo Minas Frescal.....	44
4.13 Amostras bacterianas.....	44
4.14 Contagem de coliformes a 35°C e a 45°C – Técnica Spread Plate.....	45
4.15 Fórmula do cálculo da eficiência (CE).....	45

4.16. Análises estatísticas.....	45
V RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	47
VI CONCLUSÃO .....	86
VII REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	88
APÊNDICES .....	105
APÊNDICE 1 .....	106
APÊNDICE 2.....	107
APÊNDICE 3.....	121
APÊNDICE 4.....	125
APÊNDICE 5.....	126
APÊNDICE 6.....	127

## LISTA DE ABREVIATURAS

A/E – Ligação e entumescimento (“attaching and effacing”)

afa - adesina afimbrial

DAEC – *Escherichia coli* que adere difusamente

eae – gene de ligação e entumescimento (“attaching and effacing”)

EaggEC – *Escherichia coli* enteroagregativa

EHEC - *Escherichia coli* enterohemorrágica

EIEC - *Escherichia coli* enteroinvasora

EPEC - *Escherichia coli* enteropatogênica clássica

ETEC *Escherichia coli* enterotoxigênica

ExPEC - *Escherichia coli* Patogênica Extraintestinal

LB – Meio de cultura Luria Bertoni

O – antígeno somático

PAI – Ilha de patogenicidade

pap – pili associada a pielonefrite

PCR - Reação de Polimerase em Cadeira

sfa – adesina S fimbrial

STEC - *Escherichia coli* shigatoxigênica

stx – shigatoxina.

## LISTA DE TABELAS

TABELA	TÍTULO	Páginas
<b>Tabela 01</b>	<i>Primers</i> usados na PCR para amplificação dos fragmentos específicos dos genes <i>stx1</i> , <i>stx2</i> e <i>eae</i>	39
<b>Tabela 02</b>	<i>Primers</i> usados na PCR para amplificação dos fragmentos específicos dos genes <i>pap</i> , <i>sfa</i> , <i>afa</i> .	40
<b>Tabela 03</b>	Resultados das contagens de coliformes a 35°C e coliformes a 45°C efetuadas em queijos Minas “Frescal” produzidos na região do Triângulo Mineiro.	47
<b>Tabela 04</b>	Análise de Variância das médias aritméticas dos coliformes a 35°C.	48
<b>Tabela 05</b>	Análise de Variância das médias aritméticas dos coliformes a 45°C.	48
<b>Tabela 06</b>	Distribuição das contagens microbiológicas em Número Mais Provável (NMP/g) de coliformes a 45° C e número de amosras de queijo Minas Frescal, inspecionados com SIF, produzidos artesanalmente (sem SIF) e temperados colhidos na região do Triângulo Mineiro	49
<b>Tabela 07</b>	Número de amostras positivas pela Técnica de Tubos Múltiplos com amostras de queijo com SIF, queijo sem SIF e queijo temperado comparado com a presença de coliformes a 45°C e <i>Escherichia coli</i> .	53
<b>Tabela 08</b>	Contaminação por <i>Enterobacteriaceae</i> em amostras obtidas de queijo Minas Frescal com SIF, sem SIF e temperado coletadas na região do Triângulo Mineiro.	55
<b>Tabela 09</b>	Análise dos sorogrupos de 330 estirpes de <i>Escherichia coli</i> isolados de amostras de queijo tipo Minas Frescal produzidos com leite pasteurizado com SIF, de amostras produzidas com leite cru sem SIF e de amostras de queijo temperado com especiarias comercializadas na região do Triângulo Mineiro.	57

<b>Tabela 10</b>	Distribuição da resistência aos antimicrobianos das estirpes de <i>Escherichia coli</i> isoladas de amostras obtidas de queijo Minas Frescal produzidos com SIF, sem SIF e queijo temperado comercializados na região do Triângulo Mineiro.	62
<b>Tabela 11</b>	Resistência múltipla apresentada pelas amostras de <i>E. coli</i> isolados dos queijos tipo Minas Frescal.	67
<b>Tabela 12</b>	Resultados da contagem em Unidade Formadora de Colônia (UFC) de coliformes a 35°C nos queijos produzidos com leite cru e temperados com 1% de orégano, 1% de salsinha e 0,5% de orégano acrescido de 0,5% de salsinha.	70
<b>Tabela 13</b>	Resultados da análise estatística dos resultados da contagem em Unidade Formadora em Colônia (UFC) dos coliformes a 35° C nos queijos tipo Minas Frescal inoculados com especiarias.	71
<b>Tabela 14</b>	Resultado do teste ANOVA para o grupo de queijo temperado analisados para coliformes a 35° C.	73
<b>Tabela 15</b>	Resultados da contagem de Unidade Formadora de Colônia (UFC) de coliformes a 45° C dos queijos produzidos com leite cru e temperados com 1% de orégano, 1% de salsinha e 0,5% de orégano acrescido de 0,5% de salsinha.	74
<b>Tabela 16</b>	Resultado da análise estatística descritiva mostrando a distribuição dos dados e variabilidade nos grupos de queijos analisados para coliformes a 45°C.	75
<b>Tabela 17</b>	Resultados do teste ANOVA, complementar Tukey para comparação das médias nas amostras nos respectivos grupos analisados.	77
<b>Tabela 18</b>	Resultados em Unidade Formadora de Colônia (UFC) de coliformes a 35°C isolados do queijo controle dos queijos temperados acrescidos de <i>E. coli</i> (ATCC 25922).	78
<b>Tabela 19</b>	Estatística descritiva da contagem dos coliformes a 35°C isolados dos diferentes grupos de queijo temperados e inoculados com <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922.	79

<b>Tabela 20</b>	Resultados e significância do teste ANOVA e Tukey da contagem de Unidade Formadora de Colônia dos coliformes a 35°C dos diferentes grupos de queijo.	81
<b>Tabela 21</b>	Valores de Unidade Formadora de Colônia de coliformes a 45° C do queijo produzido com leite cru acrescentado com <i>Escherichia coli</i> (ATCC 25922).	82
<b>Tabela 22</b>	Dados da estatística descritiva da contagem dos coliformes a 45°C dos diferentes grupos de queijo inoculados com <i>Escherichia coli</i> (ATCC 25922).	83

## LISTA DE FIGURAS

<b>FIGURA</b>	<b>TÍTULO</b>	<b>Páginas</b>
<b>Figura 01</b>	Estrutura molecular da cefalotina (1 <sup>a</sup> Geração)	22
<b>Figura 02</b>	Estrutura molecular da ceftriaxona (3 <sup>a</sup> Geração)	23
<b>Figura 03</b>	Estrutura molecular da Estreptomicina	24
<b>Figura 04</b>	Estrutura molecular da Tetraciclina	25
<b>Figura 05</b>	Estrutura molecular do ácido nalidíxico	26
<b>Figura 06</b>	Estrutura molecular da ciprofloxacina	26
<b>Figura 07</b>	Fluxograma da produção artesanal do queijo Minas Frescal (modificado de Behmer, 1999).	44
<b>Figura 08</b>	Resultado da quantidade de queijo com SIF, sem SIF e temperado que atendem ou não atendem a RDC n <sup>o</sup> 12.	52
<b>Figura 09</b>	Eletroforese de produtos de amplificação por PCR em gel TAE 1,5% dos fragmentos específicos dos genes <i>sfa</i> .	59
<b>Figura 10</b>	Eletroforese de produtos de amplificação por PCR em gel TAE 1,5% para a detecção dos genes <i>stx</i> e <i>stx2</i> isolados do queijo tipo Minas Frescal.	60
<b>Figura 11</b>	Resistência antimicrobiana das 330 estirpes de <i>Escherichia coli</i> isoladas a partir de queijo tipo Minas Frescal produzido com SIF, sem SIF e temperado comercializados na região do Triângulo Mineiro, MG, para cada antibiótico testado	63
<b>Figura 12</b>	Distribuição dos padrões da sensibilidade, resistência e intermediário + resistência dos antibióticos isolados de queijo tipo Minas Frescal na região do Triângulo Mineiro.	64

<b>Figura 13</b>	Distribuição de multi-resistência a nove antimicrobianos em 330 estirpes de <i>Escherichia coli</i> isolados de amostras de queijos tipo Minas Frescal com SIF, sem SIF e queijo temperado, comercializados na região do Triângulo Mineiro.	65
<b>Figura 14</b>	Resultados da Unidade Formadora de Colônia dos coliformes a 35°C, isolados nos grupos de queijos com relação aos quartis, desvio padrão e valor discrepante ( <i>outliers</i> ).	72
<b>Figura 15</b>	Resultados das médias, quartis, pontos discrepantes e variabilidade dos dados do coliformes a 45°C.	76
<b>Figura 16</b>	Resultados das médias, quartis e variabilidade dos dados dos coliformes a 35° C dos queijos elaborados com leite cru acrescidos de <i>Escherichia coli</i> (ATCC 25922).	80
<b>Figura 17</b>	Resultados das médias, quartis e variabilidade dos dados do coliformes a 45°C do queijo elaborado com leite cru acrescido de <i>Escherichia coli</i> (ATCC 25922).	84



## AVALIAÇÃO MICROBIOLÓGICA DE QUEIJOS TIPO MINAS FRESCAL COMERCIALIZADOS NA REGIÃO DO TRIÂNGULO MINEIRO

**RESUMO** – No presente trabalho foram analisadas 111 amostras de queijos Minas Frescal. As análises compreenderam a determinação do Número Mais Provável de coliformes a 35°C e a 45°C e pesquisa de *E. coli*. Os resultados mostraram a presença de coliformes a 45°C acima dos valores permitidos pela legislação em 30% dos queijos com SIF, 70% dos queijos sem SIF e 61,4% dos queijos temperados. Das *Enterobacteriaceae* isolados nos queijos Minas Frescal verificou-se presença de *E. coli*, *Proteus*, *Providencia*, *Serratia*, *Klebsiella* e *Enterobacter*. Foram isoladas e identificadas 1.243 *E. coli* e dessas amostras foram separadas aleatoriamente 330 estirpes, para pesquisar a presença do gene *stx*<sub>1</sub>, *stx*<sub>2</sub> e *eae*, a detecção dos genes codificadores de adesinas (*pap*, *afa* e *sfa*) pela reação em cadeia da polimerase e o teste de sensibilidade aos antimicrobianos. Nenhuma estirpe testada identificou presença de *stx* e *eae* não havendo *E. coli* produtoras de toxina e uma estirpe apresentou o gene *afa*. Para o teste de sensibilidade as *E. coli* de todos os queijos testados apresentaram índices de resistência à tetraciclina. Neste trabalho, avaliou-se o efeito inibitório do *Origanum vulgare* e da *Petroselinum sativum* testando-os sobre coliformes a 35°C e a 45°C do queijo produzido com leite cru e dos queijos produzidos com leite cru acrescidos de *E. coli* (ATCC 25922). Os resultados dessas plantas no leite cru não promoveram efeito inibitório sobre os coliformes a 35°C, no entanto, promoveram um efeito inibitório significativo nos coliformes a 45°C. No leite inoculado com *E. coli*, os resultados apresentaram efeito inibitório para os coliformes a 35°C e a 45°C.

**Palavras chave:** *Enterobacteriaceae*, Leite, Antimicrobianos, Especiarias,

## MICROBIOLOGICAL EVALUATION OF CHEESE OF FRESH “MINAS” TYPE COMMERCIALIZED IN THE REGION OF TRIÂNGULO MINEIRO

**ABSTRACT** - In the present study, 111 samples of cheese of Fresh “Minas” type were analyzed. The analysis include the determination of the most likely number of coliforms at 35°C and at 45°C and research of *E. coli*. The results showed the presence of coliforms at 45°C above the values allowed by the legislation in 30% of the cheese with SIF, 70% of the cheese without SIF and 61.4% of the seasoned cheese. Out of the *Enterobacteriaceae* isolated in the cheese of Fresh “Minas” type and the *E. coli*, *Proteus*, *Providencia*, *Serratia*, *Klebsiella* e *Enterobacter* presence was determinated. 1,234 *E. coli* were isolated and identified and 330 stocks were randomly separated out of these samples to research the presence of the *stx*<sub>1</sub>, *stx*<sub>2</sub> and *eae* gene, the detection of the adhesine codifier genes (*pap*, *afa* and *sfa*), through the chain reaction of polymerase and the sensibility test to antimicrobials. No tested stock identified the presence of *stx* and *eae*, no *E. coli* toxin producers and a stock showed the *afa* gene. For the sensibility test, the *E. coli* of all the tested cheese showed endurance index to tetracycline. In this study, it was evaluated the inhibitory effect of the *Origanum vulgare* and the *Petroselinum sativum* by testing them on the coliforms at 35°C and at 45°C of the cheesed produced with raw milk and the ones produced with raw milk and *E. coli* (ATCC 25922). The results of these plants in the raw milk did not provoke inhibitory effect on the coliforms at 35°C, however, they provoked a significant inhibitory effect in the coliforms at 45°C. In the milk inoculated with *E. coli*, the results showed inhibitory effect for the coliforms at 35°C and at 45°C.

**Keywords:** *Enterobacteriaceae*, Milk, Antimicrobials, Spices,

## I INTRODUÇÃO

Dentre os produtos derivados de leite, o queijo é considerado um veículo frequente de patógenos de origem alimentar e, em especial, os queijos frescos artesanais por serem elaborados a partir do leite cru e por não sofrerem processos de maturação. A contaminação microbiológica dos produtos assume destacada relevância tanto para a indústria pelas perdas econômicas, como para a saúde pública, pelo risco de causar doenças transmitidas pelo alimento (FEITOSA et al., 2003).

O queijo Minas Frescal é um queijo para o consumo imediato e de curta vida-de-prateleira, devendo ser comercializado logo após fabricação. Segundo ROCHA et al. (2006), o queijo apresenta susceptibilidade a contaminações microbianas, que podem ocorrer a partir do leite utilizado como matéria-prima ou por contaminações cruzadas durante ou após processamento. As contaminações, aliadas às alterações decorrentes podem, em poucos dias, tornar o queijo inaceitável ou até mesmo impróprio para consumo.

Mesmo com as pressões de modernização dos processos de produção, preocupação com boas práticas de fabricação e controle de qualidade que, no curso da história, forçaram a introdução da pasteurização do leite destinado à fabricação de queijos, segundo ALEXANDRE et al. (2002), as práticas tradicionais de fabricar o queijo com os leites crus ainda permanecem vivas e atuantes no Brasil. Com relação à produção de queijos na região do Triângulo Mineiro, verifica-se a grande quantidade de indústrias de micro e pequeno porte, com produção informal, que não seguem os parâmetros estabelecidos pela legislação, predominando o uso de leite não pasteurizado (CARDOSO & ARAÚJO, 2004).

Atualmente, o interesse na qualidade dos alimentos aumentou consideravelmente, sobretudo, no que diz respeito aos perigos associados com contaminantes e metabólitos. A qualidade microbiológica do queijo é de primordial importância, por estar relacionado à saúde pública (FERNANDES et al., 2006).

Em determinadas condições, o leite e seus derivados podem transmitir uma série de doenças. Dentre os microrganismos mais relevantes podem ser mencionados os pertencentes à família *Enterobacteriaceae*, que apresenta importância não somente por indicar contaminação fecal, mas também por estarem geralmente implicados em processos infecciosos, demonstrando, ainda, um grau considerável de deficiência higiênico-sanitária na elaboração do produto (HOFFMANN et al., 2004).

Os microrganismos indicadores são utilizados para avaliar a qualidade microbiológica dos alimentos e também apontam riscos de contaminações de origem fecal, a provável presença de patógenos ou deterioração potencial do alimento e indicações relevantes sobre as condições higiênico-sanitárias no processamento, na produção e no armazenamento (CARDOSO & ARAÚJO, 2004).

Na rotina de exames bacteriológicos de um laboratório, observa-se que aproximadamente 90% dos isolados são bactérias Gram-negativas, e que 95% pertencem à família *Enterobacteriaceae*, na qual a *E. coli* inclui-se no quadro das espécies mais comumente identificadas. No caso do Homem, estas bactérias podem determinar processos entéricos, assim como uma variedade de infecções extra-intestinais. Segundo a American Public Health Association (1995), estima-se que a ocorrência no mundo de episódios diarréicos é de um bilhão por ano, atingindo, particularmente crianças menores de cinco anos. A *E. coli* presente tem como consequência elevada letalidade (BRASIL, 2001).

Tais microrganismos podem comportar-se como oportunistas, considerando a resistência orgânica e as diferentes categorias de ingestores. A ingestão, por sua vez, do alimento contaminado será muito mais grave, considerando não só a faixa etária dos consumidores bem como a subnutrição, o que tornaria os ingestores muito mais vulneráveis à microbiota patógena, potencialmente patogênica e oportunista, implicando em problemas de saúde pública (HOFFMANN et al., 2004).

Bactéria patogênica em alimentos é uma questão de segurança alimentar mundial. Os riscos de doenças humanas associados com produtos crus podem ser mais bem previstos por monitoramento de pontos potenciais de contaminação microbiana na área durante a coleta, durante o processamento e distribuição ou no

varejo. Assim a rápida e exata identificação de bactéria patogênica nas amostras de alimentos são importantes, para garantia da qualidade do alimento e para localizar surtos de bactérias patogênicas (BHAGWAT, 2003).

MANTILLA et al. (2008) e RAPINI et al. (2004), citaram que a ingestão de alimentos contendo resíduos de fármacos antimicrobianos pode ocasionar resistência bacteriana aos antimicrobianos utilizados no tratamento de enfermidades infecciosas humanas. O uso de agentes antimicrobianos nas rações animais é um fato que tem levado ao surgimento de microrganismos resistentes e tem contribuído para a ineficácia destes produtos na prática terapêutica. Por essa razão, tornaram-se necessárias investigações do comportamento das bactérias frente aos antimicrobianos. TAVARES (1990) descreveu que a resistência bacteriana aos agentes antimicrobianos pode ser uma característica natural das várias espécies de bactérias, podem ser adquiridas ou podem ainda ser cepas individuais dentro de uma população sensível. De acordo com GILMAN et al. (1996), podem ocorrer amplas variações na sensibilidade de diferentes cepas da mesma espécie bacteriana aos agentes antimicrobianos. É de domínio público que os antibióticos tenham sido valiosos instrumentos na luta contra os microrganismos e doenças, porém, muitas cepas adquiriram resistência aos agentes antimicrobianos e transferiram-na às gerações posteriores. Logo, antes de escolher o fármaco, é essencial obter informações sobre o padrão de sensibilidade do microrganismo infectante. O sucesso da terapia com base em antimicrobianos depende, entre outros aspectos, do conhecimento da sensibilidade do agente etiológico *in vitro*.

Segundo BARBOSA et al. (2007), os alimentos de origem animal são considerados importantes vetores para a transferência de resistência aos microrganismos. Tal transferência é possível por meio da presença de resíduos de antibióticos no alimento e transferência de patógeno pelo alimento. As indústrias de alimentos têm passado por constantes pressões dos consumidores para que sejam removidos os conservantes químicos e que adotem alternativas naturais para a preservação do tempo de vida dos produtos alimentícios (CARVALHO et al., 2006). Assim, atualmente tem sido reconhecido que é crescente o número de consumidores que tem exigido da indústria de alimentos a adoção de uma política decrescente do uso

de aditivos químicos, tomando como base a toxicidade ou suspeita de toxicidade de alguns aditivos químicos e o abuso de utilização dos compostos. Com o objetivo voltado para segurança alimentar, os aspectos legislativos da produção de alimento têm demandado uma diminuição nos índices de utilização de aditivos químicos na indústria bem como o objetivo ao retardo das ações microbianas de caráter deteriorante, que conduzem o alimento a um estado impróprio para o consumo (SOUZA et al., 2005<sup>a</sup>). Além disso, a legislação tem restringido e/ou limitado o emprego de alguns conservantes comumente utilizados em diferentes alimentos. Isto tem criado problemas para a indústria, pois alguns microrganismos apresentam resistência aos agentes preservantes utilizados de forma rotineira (ERNANDEZ & GARCIA-CRUZ, 2007).

Nesse panorama, muitas pesquisas em todo o mundo vêm sendo desenvolvidas enfatizando a busca de compostos alternativos úteis e viáveis para o emprego racional como conservantes naturais na produção de alimentos. FRANCO et al. (2005), citaram que para obter soluções efetivas com os fitofármacos deve-se promover um inter-relacionamento das diferentes áreas do conhecimento, incluindo botânica, microbiologia, fitoquímica e a epidemiologia, evitando-se estudos de forma isolada que levariam a resultados ineficientes. Logo, impulsionou a crescente investigação da potencialidade antimicrobiana, sendo a preocupante realidade do progressivo surgimento de cepas microbianas resistentes aos antimicrobianos em todos os campos de estudo da microbiologia.

O abuso por longos anos da utilização de compostos antimicrobianos apresenta-se como o fator principal de pressão para o surgimento de tal fenômeno de resistência (SOUZA et al., 2005<sup>b</sup>). Nesse sentido, o uso de plantas medicinais sob formas de extrato e fitofármacos, ganha importância na terapêutica atual (FRANCO et al., 2005). Conforme INDU et al. (2006), estima-se que 80% da população mundial utilizam de plantas medicinais para a necessidade da saúde. As substâncias antibióticas nas plantas são detectadas pela observação de crescimento de microrganismos colocados em contato com tecidos ou extratos das plantas (SOUZA, 2000). Com a difusão das modernas técnicas de preservação houve interesse acentuado e renovado sobre algumas especiarias, utilizadas como condimentos alimentares.

## II OBJETIVOS

Assim com o presente trabalho foram:

- Determinadas e quantificadas pela Técnica de tubos múltiplos o número de coliformes a 35°C e a 45°C;
- Isoladas e identificadas a presença de *Enterobacteriaceae* nas amostras de queijo tipo Minas Frescal comercializados na região;
- Avaliadas a presença de *E. coli* entre os coliformes a 45° C;
- Determinada a presença de estirpes de *E. coli* virulentas com base na presença dos genes *stx1*, *stx2* e *eae*;
- Verificada a presença do gene *apa*, *afa*, *sfa* nas *E. coli* isoladas;
- Determinado o perfil de resistência a nove antimicrobianos sobre das estirpes de *E. coli* isoladas;
- Verificado o perfil de resistência múltipla às drogas antimicrobianas;
- Verificada a eficiência das especiarias orégano e salsinha sobre os microrganismos coliformes a 35°C e a 45°C (estirpes selvagens) presentes no queijo e
- Verificada a eficiência das especiarias orégano e salsinha sobre a *E. coli* ATCC 25922 inoculada no queijo Minas Frescal.

### III REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

#### 3.1 Importância do queijo

A indústria de queijo expandiu no Brasil em relação à década passada (SAPATA et al., 2008; ARAÚJO et al., 2001<sup>a</sup>) e a elaboração de queijo constitui uma das mais importantes atividades na indústria de laticínios, sobretudo, nas regiões Sul e Sudeste do Brasil, cuja produção se concentra principalmente em indústrias de pequeno e médio porte. Sua fabricação originou-se no estado de Minas Gerais com procedimentos caseiros (SAPATA et al., 2008; QUINTANA & CARNEIRO, 2007).

Tem se verificado, nos últimos anos, uma migração importante e consistente da produção de leite do Sul e Sudeste para as regiões centrais do país, especialmente aquelas localizadas em áreas do cerrado, como Triângulo Mineiro, Alto Paranaíba em Minas Gerais e Estado de Goiás. Tal migração é uma tendência irreversível e resultante da combinação de diversas vantagens que essas regiões oferecem: condições climáticas favoráveis à produção de forragens e grãos a preços competitivos, baixo custo da terra, localização privilegiada em relação aos principais centros consumidores do país e o aumento da especialização e modernização em nível da propriedade rural (NICOLAU et al., 2004). Dada a sua importância, SABIONI & PINHEIRO (2008), comentam que os queijos Minas artesanais produzidos nas regiões do Alto do Paranaíba e de Araxá foram tombados em 2002 como Patrimônios Imateriais de Minas Gerais.

No Brasil, a indústria de laticínio é expressiva, sendo que, em 2008, foram produzidos 22.654.082 litros de leite, destes, 6.153.228 (27,2%) litros são produzidos no estado de Minas Gerais (ANUALPEC, 2009) sendo que, em 2002, foram produzidas 31.762 toneladas de queijo Minas Frescal (BARROS et al., 2004) e, em 2008, houve um aumento na produção de 4,5% de queijo no Brasil (ANUALPEC, 2009).



### 3.2 Queijo

Considerando que o leite é a principal matéria-prima do queijo, aumenta-se a preocupação com o produto. O leite é considerado o alimento mais complexo existente para o consumo humano, pois possui alto valor biológico, uma vez que são compostos de carboidratos, proteínas, vitaminas e sais minerais. É largamente utilizado para o preparo de derivados, os quais mantêm em sua composição praticamente todos os componentes nutritivos do leite. Para o preparo desses derivados, a matéria-prima deve ser obtida em condições higiênico-sanitárias ideais e ser resfriado logo após sua obtenção, pois os elementos contidos no leite formam um excelente substrato para o crescimento de microrganismos, afetando a qualidade do produto final (ALBUQUERQUE & RODRIGUES, 2008).

A produção de queijo modifica a microbiota bacteriana do leite de modo a evitar, até certo ponto, a multiplicação de agentes de doenças (ALMEIDA & FRANCO, 2003). O queijo apresenta vários pontos críticos, durante a fabricação, que podem conduzir a alterações e até recontaminação no produto final (ROSA et al., 2005). Segundo ARAÚJO et al. (2001<sup>b</sup>), o queijo é uma das formas mais antigas de conservação do leite, pois surgiu praticamente com a domesticação de animais produtores de leite. É um produto apreciado tanto pelo valor nutritivo como pelo sabor que atende aos paladares mais exigentes. Tem ampla aceitação comercial e faz parte do hábito alimentar da população, na maioria das regiões do país (LEITE et al., 2005). Conforme BARROS et al. (2004), o queijo comercializado a preços relativamente acessíveis, chegou à condição de terceiro queijo mais consumido pela população. A qualidade dos produtos lácteos incentiva a aceitação e demanda dos consumidores. Apesar das exigências para que o leite destinado ao fabrico de queijos seja higienizado por meios mecânicos adequados e submetidos à pasteurização ou tratamento térmico equivalente (BRASIL, 1974), é intensa a comercialização dos queijos Minas fora dessas especificações. Além disso, a contaminação do leite pós-pasteurização, a utilização de fermentos inativos e temperaturas inadequadas, e incorretas condições de manufatura e armazenagem contribuem, também de forma efetiva, para a má qualidade do produto

final (PEREIRA et al., 1999). Apesar de a legislação brasileira exigir a utilização de leite pasteurizado no preparo é bastante frequente a comercialização do produto que não atende a esta especificação legal (LOGUERCIO & ALEIXO, 2001).

De acordo com o decreto lei nº 30.691 (BRASIL, 1997<sup>a</sup>) e o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Produtos Lácteos (BRASIL, 1997<sup>b</sup>) entende-se que o queijo Minas Frescal é um queijo fresco branco, produzido a partir de leite de vaca pasteurizado, caracterizado por alta atividade de água, baixo pH (5,1 – 5,6) e 6% de cloreto de sódio (NaCl) (CAMPOS et al., 2006). Possui cerca de 43 a 55% de umidade e uma vida de prateleira de 10 a 14 dias. Na fabricação, utiliza-se coalho enzimático ou químico, remove-se o soro e realiza-se a moldagem e a salga. Esse queijo tem ampla aceitação comercial e faz parte do hábito alimentar da população das diversas regiões do país (BRASIL, 1997<sup>b</sup>, ÁLVARES et al., 2005; ISEPON et al., 2003; PEREIRA et al., 1999).

Segundo a orientação contida no Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Produtos Lácteos (BRASIL, 1997<sup>b</sup>), os queijos Minas podem ser classificados em queijos de baixa umidade ou de massa semi-dura, com umidade entre 36,0 a 45,9%, queijos de alta umidade ou de massa branda ou “macios” com 46,0 a 54,9% de umidade e queijos de muito alta umidade ou de massa branda ou “mole”, com umidade não inferior a 55,0%, representados, respectivamente, pelos queijos canastra, padronizados e frescal (PEREIRA et al., 1999).

No Brasil, existem vários tipos de queijos frescos produzidos de forma artesanal e industrial, tanto por pequenos produtores quanto por algumas indústrias (SALOTTI et al., 2006). DUARTE et al., (2005) e LEITE et al. (2005), citaram que os alimentos obtidos por processos artesanais têm grande possibilidade de se apresentarem contaminados, devido ao uso de matérias-primas de fontes não seguras, utensílios mal higienizados ou contaminados. Quando o produto é fabricado de forma artesanal, por pessoas não treinadas, pode ocorrer a contaminação por diversos microrganismos, comprometendo tanto a qualidade, como a segurança da saúde do consumidor. Por esse motivo, as práticas higiênicas devem ser observadas com rigor, para prevenir uma possível contaminação ou re-contaminação do produto. Além disso, por não ser

maturado, é um produto perecível, devendo ser consumido rapidamente após curta estocagem em ambiente refrigerado (LOGUERCIO & ALEIXO, 2001; FEITOSA et al., 2003; SALOTTI et al., 2006; ROCHA et al., 2006).

A contaminação microbiana desses produtos assume destacada relevância tanto para a indústria, pelas perdas econômicas como para a Saúde Pública, pelo risco de causar doenças transmitidas por alimentos (FEITOSA et al., 2003), além de comprometer suas características sensoriais bem como torná-lo impróprio para o consumo em virtude da contaminação por microrganismos (ARAÚJO et al., 2001<sup>b</sup>).

### **3.3 Coliformes e *Escherichia coli***

Segundo ALMEIDA & FRANCO (2003), a presença de coliformes em queijos tem-se tornado cada vez mais preocupante, pelo surgimento de surtos de toxinfecções alimentares.

Os grupos de coliformes a 35°C e a 45°C colonizam o trato intestinal de animais de sangue quente, incluindo os homens e têm sido empregados como indicadores de qualidade higiênica por muitos anos. Apesar das controvérsias com relação aos microrganismos mais representativos da qualidade sanitária de um produto alimentício, os coliformes, em geral, a *E. coli* têm merecido maior consideração.

Destaca-se que uma grande parte do queijo é fabricada a partir de leite cru sendo um problema na área da saúde pública, pois se constitui em um veículo para inúmeros agentes etiológicos de enfermidades zoonóticas entre eles a *E. coli* (CAMPOS et al., 2006). Diversos relatos indicam que queijos do tipo Minas Frescal comercializados no Brasil são amplamente contaminados. ARAUJO et al. (1997) observaram que 100% das amostras de queijo Minas Frescal analisadas de supermercados e padarias da cidade de Rio de Janeiro revelaram presença de coliformes a 45°C em níveis acima da portaria vigente. OLIVEIRA et al. (1998) relataram a detecção 46,9% de coliformes a 35°C e 9,4% de coliformes a 45°C em amostras de queijo Minas Frescal nas fábricas de laticínios da região nordeste do

estado de São Paulo. No Brasil, tem-se evidenciado a presença de microrganismos patogênicos em queijo Minas Frescal, sendo amplamente reconhecida a presença de coliformes fecais no produto em vários estudos realizados em diferentes locais, como em Cuiabá por PEREIRA et al., 1999, LOGUERCIO & ALEIXO, 2001, em Poços de Caldas, MG, ALMEIDA FILHO & NADER FILHO, 2002, em cidades do interior do Paraná KOTTWITZ & GUIMARÃES, 2003, no Rio de Janeiro BARROS et al., 2004, ALMEIDA & FRANCO, 2003 em Três Passos, ROSSI & ANDREAZI, 2005 e CAMPOS et al., 2006 na cidade de Goiás.

As bactérias do grupo coliforme são consideradas como principais agentes contaminantes associados à deterioração de queijos, causando fermentações anormais e estufamento precoce dos produtos (ALMEIDA & FRANCO, 2003).

Segundo PEREIRA et al. (1999) os coliformes representados pelos gêneros *Escherichia*, *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Serratia*, *Hafnia* e *Citrobacter*, fermentadores de lactose da família *Enterobacteriaceae* são frequentemente utilizados como indicadores higiênico-sanitários, em controle de qualidade de água e alimentos. Sabe-se, contudo, que o grupo coliforme não se comporta de maneira uniforme no que diz respeito à especificidade de habitat e tempo de sobrevivência em outros ambientes que não o trato intestinal (ICMSF, 1983). As bactérias do grupo coliforme se distinguem, assim, em fecais e não fecais. As primeiras são encontradas no trato intestinal do homem e de mamíferos, sendo incapazes de persistir por longo tempo em outros ambientes que não as fezes.

O Ministério da Saúde, através da Resolução nº 12, de 02 de janeiro de 2001, da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (BRASIL, 2001) adotou a denominação coliformes a 45°C, considerando os padrões “coliformes de origem fecal” e “coliformes termotolerantes” como equivalente a coliformes a 45° C.

A denominação coliforme fecais foi utilizada durante muitos anos para descrever coliformes que fermentavam a lactose com produção de gás a 44,5°C. *E. coli* e algumas cepas de *Klebsiella* e *Enterobacter* apresentam esta característica de termotolerância, porém somente *E. coli* tem como habitat primário o intestino humano e de animais (SILVA et al., 2006).

As *Klebsiella* e *Enterobacter* podem ser encontrados em outros ambientes, como vegetais e solo onde persistem por tempo superior ao das bactérias patogênicas de origem intestinal. Portanto, não é correta a relação direta da presença de coliformes termotolerantes em alimentos com contaminação fecal, o que levou à necessidade de modificar, na legislação brasileira, a denominação coliforme fecais para coliformes a 45°C (SILVA et al., 2006).

ALMEIDA & FRANCO (2003) citam que a presença de coliformes em queijos vem se tornando cada vez mais preocupante, pelo surgimento de surtos de toxinfecções alimentares por *E. coli* patogênica.

Os coliformes a 45°C, população predominantemente constituída por *E. coli*, caracterizam um grupo de microrganismos indicativos de contaminação de origem fecal. De acordo com normas estabelecidas pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (BRASIL, 2001), a Resolução RDC nº 12 de 02 de janeiro (BRASIL, 2001), estabelece um valor limite de acordo com a umidade do produto. Para queijos que apresentam alto teor de umidade, como o queijo Minas Frescal foi estabelecido um valor aceitável mínimo de  $5 \times 10$  NMP/g e máximo de  $5 \times 10^2$  NMP/g de coliformes a 45°C e para queijo de muito alta umidade, temperados, condimentados ou adicionado de ervas ou outros ingredientes foi estabelecido valor aceitável mínimo de  $5 \times 10$  NMP/g e máximo de  $10^2$  NMP/g. A presença desses microrganismos em índices condenatórios acima de  $5 \times 10^2$  NMP/g, já foi relatada valor em queijo tipo “Minas” por COLEN et al., 1984; PEREIRA et al., 1987, LAICINI, 1993; SOUZA et al., 1993; DIAS et al., 1995; RODRIGUES et al., 1995; CARVALHO et al., 1996. Essa contaminação, além de identificar as más condições higiênicas do produto, indica também a possibilidade de transferência de patógenos pertencentes aos grupos *E. coli* enteropatogênica (EPEC), *E. coli* enterotoxigênica (ETEC), *E. coli* enteroinvasiva (EIEC), *E. coli* enterohemorrágica (EHEC), *E. coli* enteroagregativa (EAEC ou EaggEC) e *E. coli* difusa aderente (DAEC) (LOGUERCIO & ALEIXO, 2001).

### **3.4 *Escherichia coli* comensal**

Segundo TRABULSI et al. (2005) a *E. coli* podem-se distinguir dois grandes grupos de amostras: um que habita os nossos intestinos desde o nascimento até a morte; e outro que causa diferentes tipos de infecção. O primeiro grupo é geralmente chamado de *E. coli* comensal; e o outro de *E. coli* patogênica. As cepas de *E. coli* são consideradas comensais por se adaptarem passivamente com seu hospedeiro sem causar doenças, sendo que na sua maioria são deficientes de fatores de virulência (CARDOSO, 2009, JOHNSON & RUSSO, 2002). Assim, as amostras comensais (sem potencial patogênico), em sua grande maioria são agrupadas em grupos filogenéticos A e B1 e as amostras patogênicas intestinais agrupam-se igualmente em A, B2 e D. Diferentemente, as amostras patogênicas extra-intestinais (ExPEC) são, em sua maioria, oriundas dos filogrupos B2 e D (SANTOS et al., 2009).

A *E. coli* comensal pode adquirir específicos atributos de virulência que são codificados em elementos genéticos, e tornar-se patogênicas (KAPER et al., 2004). Assim, a diferença de comensalismo e virulência é resultado da presença de fatores de virulência e expressão dos fatores pela bactéria. Os genes de virulência estão localizados em plasmídios, bacteriófagos ou no cromossomo bacteriano e tem sido demonstrada a possibilidade de transferência horizontal entre distintas linhagens de *E. coli* (CARDOSO, 2009).

### **3.5. *Escherichia coli* patogênica extra-intestinal (ExPEC)**

Com relação às *E. coli* patogênicas extra-intestinais, sua denominação mais frequentemente empregada reflete o sítio de isolamento e não as características que definiriam um patotipo, particularmente com relação ao conjunto de fatores de virulência que possuem. Dessa forma, as amostras isoladas de infecções urinárias são conhecidas como UPEC (*E. coli* Uropatogênica) e as isoladas de meningites como MNEC (*E. coli* associada à Meningite Neonatal) (SANTOS et al., 2009). No entanto,

sabe-se que as amostras isoladas de um determinado sítio podem causar infecções em outros sítios do hospedeiro e até mesmo em hospedeiros diversos, assim as incongruências levaram os autores RUSSO & JOHNSON (2000) a propor a denominação de ExPEC (Extraintestinal Patogênica *Escherichia coli*), no sentido de englobar todas as amostras de *E. coli* isoladas de infecções extra-intestinais, independentemente do hospedeiro e do sítio de isolamento.

As ExPEC derivam predominantemente do grupo filogenético B2 e um pouco menos do grupo D e de específicos clones desses grupos. Exibe uma ampla extensão de fator de virulência (FV) extra-intestinais, que permite que a cepa colonize as superfícies das mucosas do hospedeiro, subvertendo os mecanismos de defesa e assim adquirindo nutrientes essenciais para o seu desenvolvimento provocando no hospedeiro uma resposta inflamatória (JOHNSON, 1991).

Cepas de ExPEC tem sido frequentemente isoladas de produtos alimentícios, principalmente de alimentos de origem animal, indicando que os microrganismos representam potencialmente uma nova classe de patógenos alimentares (SMITH et al., 2007). JOHNSON (2001<sup>b</sup>) comentam que o grande risco da colonização da ExPEC no intestino humano seria a transferência de FVs, que podem converter cepas comensais em uma potencial cepa patogênica.

Os genes para múltiplos fatores de virulência frequentemente estão juntos em grandes blocos de cromossomo chamados de ilhas de patogenicidade (PAIs) (RUSSO & JOHNSON, 2000). Presume-se que os genes para FVs unem-se a estes PAIs, pois ganham vantagens quando presentes em grupos e assim podendo ser transmitidas horizontalmente para outras bactérias (JOHNSON & RUSSO, 2002).

Alguns genes encontrados nos PAIs são denominados de *pap* (pili associado a pielonifrite), *sfa* (adesina S fímbria) e *afa* (adesina afimbria) os quais são transcritos em um único segmento de RNA mensageiro e regulados por um conjunto de sequências comuns de DNA (operon)(BLANCO et al., 1997).

### 3.6 *Escherichia coli* patogênicas intestinal

Desde a ocorrência de um surto de doenças alimentares causadas por *E. coli* enteropatogênica e associadas com consumo de queijo semi-maturado, a presença destes microrganismos em queijo tem significado adicional (QUINTO & CEPEDA, 1997). O significado da *E. coli* nos alimentos deve ser avaliado sob dois ângulos: indica contaminação microbiana de origem fecal, portanto, condições higiênicas insatisfatórias; e o outro aspecto a ser considerado é que diversas linhagens são comprovadamente patogênicas para o homem e animais. A enumeração laboratorial de *E. coli* auxilia na detecção do perigo potencial de uma toxinfecção alimentar através da água e dos alimentos fornecidos ao consumo (HOBBS & ROBERTS, 1999; FRANCO & LANDGRAF, 1996).

Atualmente, o conceito de patogenicidade das cepas de *E. coli* está relacionado com o impacto acumulativo de um ou vários fatores de virulência, o qual serve para diferenciar cepas patogênicas das não patogênicas (BRITO et al., 2001). Com base nos fatores de virulência, manifestações clínicas, epidemiologia e sorotipagem, as *E. coli* consideradas patogênicas são agrupadas em classes como EPEC, ETEC, EIEC, EHEC, EAEC ou EaggEC e DAEC (BUCHANAN & DOYLE, 1997).

Conforme ALMEIDA & FRANCO (2003), a *E. coli* e seus diversos sorotipos no grupo dos coliformes fecais, podem determinar casos de diarreia em indivíduos que venham a ingerir alimentos que veiculem tais microrganismos principalmente crianças, idosos e pessoas imunodeprimidas.

#### 3.6.1 *E. coli* enteropatogênica (EPEC)

Segundo SILVA & SILVA (2005), os principais sintomas clínicos da doença causada por EPEC são diarreia aquosa acompanhada de febre, mal-estar e vômitos. Segundo STELLA (2008), a maior parte dos primeiros relatos de EPEC foi associada com surtos de diarreia em neonatos no Reino Unido e EUA. Em São Paulo, EPEC tem



sido apontada como o agente mais frequentemente isolado em crianças hospitalizadas, no primeiro ano de vida e principalmente nos primeiros seis meses de idade (OLIVA et al., 1997).

A EPEC causa a destruição das microvilosidades intestinais a partir da aderência da bactéria à membrana plasmática do enterócito, aderência mediada por fímbrias codificadas por plasmídios, ocasionando uma diarreia com febre, náuseas e vômitos (SILVA, 1998). As *E. coli* enteropatogênica (EPEC) aderem às células epiteliais como microcolônias localizadas e causam lesões de aderência destrutivas, provocando uma diarreia com abundante quantidade de muco, mas com pouco sangue. Os sorogrupos O55, O86, O111, O119, O126, O127, O128 e O142 estão comumente envolvidos neste grupo (STELLA, 2008).

EPEC são potencialmente infectantes para crianças e lactentes e a dose infectante é muito baixa. Em alguns casos de doença em adultos, o inóculo é geralmente similar a outros enteropatógenos onde cerca de  $10^6$  microrganismos são necessárias para causar infecção. Surtos de EPEC estão geralmente implicados com contaminação alimentar como ingestão de carne bovina crua e aves, embora qualquer alimento exposto à contaminação fecal seja bastante suspeito. Apesar de esporádicos, os surtos de EPEC são mais frequentes em países que possuam práticas sanitárias deficientes (cerca de 50% dos índices de mortalidade são reportados em países do terceiro mundo) (SILVA, 1998).

O mecanismo de patogenicidade da EPEC envolve a aderência às células HEp-2 formando um ou alguns grupamentos ou microcolônias na superfície da célula. O padrão de adesão é denominado adesão localizada (AL) (TRABULSI et al., 2005). Segundo os mesmos autores, o tipo de lesão histológica recebeu a designação de *Attachment/Effacement* ou lesão A/E. Há algum tempo, a identificação da EPEC era feita como base somente em relação ao antígeno O. Posteriormente, a classificação foi melhorada utilizando-se os antígenos O e H. Em seguida, começou-se a utilizar duas características para se definir uma cepa como EPEC: capacidade de promover a lesão *Attachment/Effacement* e ausência de produção de toxina *shiga* (TRABULSI et al., 2005).

A formação da lesão A/E envolve a participação de vários genes plasmidiais e cromossômicos, bem como uma resposta celular bastante complexa e intensa. O plasmídio das EPEC, que transporta os referidos genes, é conhecido como plasmídio EAF (*EPEC adherence factor*), porque desde o início verificou-se que o plasmídio é responsável pela AL (TRABULSI et al., 2005). Segundo SILVA & SILVA (2005) as principais proteínas efetoras responsáveis pelo desencadeamento da adesão íntima e A/E são a intimina e seu receptor Tir. A interação intimina – Tir permite a ancoragem da EPEC na superfície da célula hospedeira, inicia processos de sinalização celular e reorganiza os componentes do citoesqueleto para formar o pedestal. No Brasil, a *E. coli* enteropatogênica, é um dos principais microrganismos responsáveis por quadros de diarreia em crianças com o sorogrupo O111 e O119, que são os isolados de maior frequência (TRABULSI et al., 2005).

### 3.6.2 *E. coli* enterotoxigênica (ETEC)

Segundo QUINTO & CEPEDA (1997), *E. coli* enterotoxigênica (ETEC) de origem bovina tem sido classificada em três categorias: *E. coli* enterotoxigênica (ETEC), *E. coli* verotoxigênica (VTEC) e *E. coli* necrotoxigênica (NTEC).

ETEC constitui um dos mais importantes grupos entre *E. coli* e têm sido etiológicamente associadas com doenças diarreicas de todos os grupos etários de diversas localizações em todo o mundo. O microrganismo causa diarreia em crianças principalmente em países menos desenvolvidos e em turistas em visita a países em desenvolvimento (BRITO et al., 2006).

A *E. coli* enterotoxigênica tem capacidade de aderir à mucosa do intestino delgado através de fímbrias (tipo pili e antígeno de colonização) e produzir enterotoxinas (MENG et al., 2001). A etiologia da doença é similar à cólera, onde produz dois tipos de enterotoxinas: LT (LT I e LT II - toxinas termolábeis) e ST (ST I e ST II - toxinas termoestáveis, que resistem ao aquecimento a 100° C por 15 min) (SILVA, 1998).

Conforme HARVEY et al. (2008) a ETEC causa uma hipersecreção prolongada de íons cloreto e água pelas células da mucosa do intestino e inibem a reabsorção de sódio. O intestino fica repleto de fluido, resultando em diarreia líquida que permanece por vários dias.

BRITO et al. (2006) citam que para identificar e caracterizar uma ETEC, além das enterotoxinas LT e ST, precisam expressar os fatores que são os antígenos sorotipos (O), com 176 tipos; os antígenos flagelados (H), com 112 tipos; os antígenos capsulados (K), com 60 tipos, além dos fatores de colonização.

### 3.6.3 *E. coli* enteroinvasiva (EIEC)

As cepas de EIEC não possuem flagelos, fermentam ou não tardiamente a lactose. São capazes de penetrar em células epiteliais e causar manifestações clínicas semelhantes às infecções causadas por *Shigella*, pertencem a um número limitado de sorogrupos: O21, O28ac, O29, O112c, O124, O136, O143, O144, O152, O164, O167 e O173 (HOBBS & ROBERTS, 1999; FRANCO & LANDGRAF, 1996). Segundo TRABULSI et al. (2005), a EIEC assim como a shigelose provocam a infecção intestinal que consiste de inflamação e necrose da mucosa do cólon.

A patogenicidade das EIEC consiste na capacidade de invadir e se espalhar lateralmente para as células adjacentes de mucosa do cólon, onde proliferam, levando à morte celular (TRABULSI et al., 2005).

### 3.6.4 *E. coli* enterohemorrágica (EHEC)

*E. coli* enterohemorrágica (EHEC) é patogênica para os humanos e pertencem ao grupo *E. coli* shigatoxigênica (STEC) (VICENTE et al., 2005). Ela é a maior causadora de gastroenterite que pode carrear colite hemorrágica (HC) ou a síndrome urêmica hemolítica (HUS), que é a principal causa de doença renal aguda em crianças. Desde esta identificação como um patógeno em 1982, STEC O157:H7 tem sido

considerada causador de sérias doenças, especialmente no Canadá, Japão, Inglaterra e Estados Unidos (BLANCO et al., 2003, BERGAMINI et al., 2007). Embora mais de 200 sorotipos de *E. coli* produzam shigatoxina, o número de cepas consideradas patogênicas é crescente para o ser humano, entretanto o sorotipo O157:H7 é o sorotipo mais frequentemente associado com doenças alimentares (COBBOLD & DESMARCHELIER, 2000; VICENTE et al., 2005).

As estirpes de *E. coli* O157:H7 e outras *E. coli* enterohemorrágicas tornaram-se conhecidas como os principais agentes causadores de diarreia hemorrágica. Estas *E. coli* produzem uma ou mais shiga-toxinas (*stx*) ou Vero-citotoxinas. Em sentido estrito, o termo EHEC refere-se apenas aos sorotipos que causam uma doença clínica idêntica à causada pela *E. coli* O157:H, não existindo consenso sobre quando é que uma *E. coli* produtora de *stx* pode ser considerada uma EHEC (AMMON, 1997).

O principal fator de virulência de STEC é uma potente citotoxina denominada toxina *shiga*, da qual existem dois tipos: *stx*<sub>1</sub> e *stx*<sub>2</sub>. Outro fator de virulência descrito é a intimina, produto do gene *eae* (de *E. coli attachment and effacement*), uma proteína de membrana externa envolvida na adesão da bactéria aos enterócitos (NATARO & KAPER, 1998).

Sorogrupos como O157:H7, O111:H8, O26:H11, O103:H2, são referidos como STEC e com a presença do gene *eae* são frequentemente relatados como altamente patogênicos (BERGAMINI et al., 2007).

Transmissão de STEC é frequentemente relacionada ao consumo de alimentos e carnes mal cozidos, água e leite cru (VICENTE et al., 2005). Uma larga gama de outros produtos alimentares tem sido implicada em surtos de infecções por EHEC, tais como queijo, iogurte, salsichas fermentadas, suco de maçã e alface (SIMMON, 1997). Os bovinos são considerados o principal reservatório de STEC (KAPER et al., 2004). Alta ocorrência de STEC tem sido identificada em fezes de bovinos no Brasil (CERQUEIRA et al., 1999; LEOMIL et al., 2003; MOREIRA et al., 2003; IRINO et al., 2005).

Uma vigilância ativa da EHEC no homem é essencial para proteger a saúde pública. Para prevenir surtos que podem surgir da contaminação de produtos

alimentares que são largamente distribuídos, as infecções por EHEC necessitam ser continuamente monitoradas (AMMON, 1997).

### 3.6.5 *E. coli* enteroagregativa (EAEC ou EaggEC)

Existem poucos dados disponíveis em relação à EAEC; sua ocorrência em surtos alimentares ainda não foi relatada, entretanto, parecem estar associadas com casos crônicos de diarreia (FRANCO & LANDGRAF, 1996; HOBBS & ROBERTS, 1999).

A EAEC formam um padrão agregativo de adesão, quando associam com células HEp-2 ou HeLa, lembrando a disposição de tijolos empilhados (TRABULSI et al., 2005).

### 3.6.6 *E. coli* difusa aderente (DAEC)

A DAEC está associada com diarreia em crianças e é definida pela característica padrão de aderência difusa em células Hep-2 ou HeLa (TRABULSI et al., 2005). De acordo com MENG et al. (2001) não há relatos de surtos com alimentos.

## 3.7 Ocorrência de diferentes sorovares de *E. coli* em alimentos

*E. coli* enterohemorrágica e enteropatogênica (EHEC e EPEC) são relatados como patógenos humanos que são responsáveis por epidemia alimentar em todos os países do mundo (LI et al., 2004). Segundo NASCIMENTO et al. (1988) na América do Sul, a maioria das gastroenterites infantis são causadas por *E. coli* enteropatogênica clássica (EPEC). Nesse grupo estão incluídas aquelas cepas de *E. coli* que pertencem aos sorogrupos O26, O55, O86, O111, O114, O119, O125, O126, O127, O128, O142 e O158. No Brasil, cepas de EPEC são recuperadas de 30% ou mais de casos de diarreia infantil de famílias de poder econômico menor (SILVA et al., 2001).

Os surtos decorrentes da infecção por *E. coli* (EPEC, EIEC, EaggEC e EHEC) são considerados severos. A *E. coli* enterohemorrágica (EHEC) e a *E. coli* Enteroagregativa (EaggEC) destacam-se entre os microrganismos classificados como emergentes (MARTINS et al., 2003). O sorotipo O157:H7 é a EHEC mais frequentemente encontrada. A EaggEC foi descrita mais recentemente e está associada a casos crônicos de diarreia (TRABULSI et al., 2005).

Assim, determinadas cepas de *E. coli* produzem toxinas protéicas que podem exercer um papel importante na patogenia das doenças, tais como: a hemolisina, a colicina, a enterotoxina termolábil (LT); a enterotoxina termoestável (ST); a verotoxina ou “shiga-like” toxina (VT ou SLT) e o fator necrosante citotóxico (CNF) (GYLES, 1992).

### **3.8 Susceptibilidade a antimicrobianos**

A resistência bacteriana aos antimicrobianos tem emergido como um problema mundialmente importante, fazendo com que muitas classes de antimicrobianos tenham se tornado menos efetivas nos últimos anos. Algumas vezes, parte da emergência de resistência está relacionada ao uso intensivo ou inadequado desses compostos, ocasionando a seleção de patógenos resistentes (GALES et al., 1997).

O uso de antibióticos de forma indireta e em longo prazo, devido à grande exposição de microrganismo a essas drogas, pode dar origem à seleção de cepas resistentes que poderá ser transferidas entre as bactérias (TAVARES, 1990).

Nas últimas décadas, muitos métodos têm sido aplicados para comparar cepas de *E. coli* na tentativa de identificar os mecanismos de transmissão e as fontes de contaminação. Entre as técnicas fenotípicas utilizadas, o teste de susceptibilidade a antimicrobianos tem sido especialmente usado devido ao baixo custo e à facilidade de execução, além de contribuir para informar sobre a resistência microbiana (CAMPOS et al., 2006).

Entre 1970 e 1980, as bactérias Gram-negativas resistentes eram os principais obstáculos terapêuticos. Para que houvesse uso racional de antibióticos, foi recomendado que as condutas terapêuticas fossem baseadas em evidências locais,

sem negligenciar tendências de perfis de resistência bacteriana de maneira mais abrangente (ROSSI & ANDREAZZI, 2005).

### **3.9 Quimioterápicos / Antibióticos**

Quimioterapia é o tratamento de moléstia com substâncias químicas. Algumas são sintetizadas em laboratório e chamadas de quimioterápicos, já os antibióticos são produzidos na sua grande maioria por microrganismos que fazem a síntese total ou parcial da molécula e, neste caso, são concluídos em laboratórios e conhecidos como antibióticos semi-sintéticos (TRABULSI et al., 2005).

Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), o uso racional de antimicrobianos pode ser definido como: "aquele que maximiza os efeitos terapêuticos clínicos enquanto minimiza tanto a toxicidade relacionada aos medicamentos quanto o desenvolvimento da resistência antimicrobiana" (BARBOSA et al., 2008).

Os antimicrobianos são agrupados em classes, de acordo com a estrutura química e mecanismos de ação e a estrutura molecular definem os mecanismos de ação (SILVA, 1998).

#### **3.9.1 Classe Beta-lactâmicos**

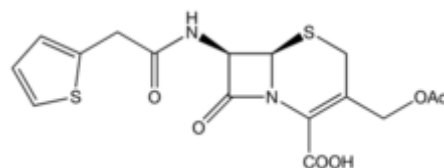
Nessa categoria, estão incluídas as penicilinas, as cefalosporinas, os monobactâmicos e as carbapenemas. Todos esses compartilham características químicas, mecanismos de ação e características imunológicas semelhantes porque possuem em comum o anel  $\beta$ -lactâmico, que é composto de três átomos de carbono e um de nitrogênio (TRABULSI et al., 2005; KATZUNG, 2003).

## a) Cefalosporinas

As cefalosporinas representam um importante e crescente grupo de antibióticos na medicina atual. Provém de um fungo, o *Cephalosporium acremonium* capaz de produzir vários antibióticos assemelhados às penicilinas, mas com a característica de serem resistentes às beta-lactamase, são considerados ativos contra microrganismos Gram-positivos e Gram-negativos (HARVEY et al., 2008).

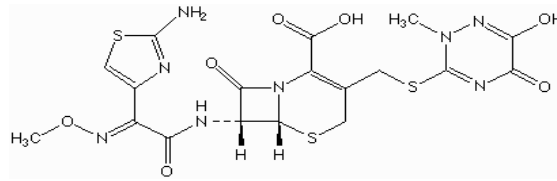
Esses antibióticos se classificam em compostos de primeira, segunda e terceira geração. Na primeira geração, encontram-se os antibióticos que iniciaram este grupo, caracterizados por um espectro de atividade antimicrobiana entre Gram-positivos e Gram-negativos, porém mais estreito do que as cefalosporinas das Segundas e Terceiras Gerações (TRABULSI et al., 2005). A primeira geração é representada pela cefalotina, cefazolina, cefapirina, cefradina, cefalexina e cefadroxil, a Segunda Geração consiste no cefamandol, na cefoxitina, no cefaclor e na cefuroxima. Estas cefalosporinas têm maior atividade contra bactérias entéricas Gram-negativas. As cefalosporinas da terceira geração possuem espectro antibacteriano, ainda mais amplo contra as bactérias Gram-negativas, inclusive contra bactérias resistentes a outras cefalosporinas. Têm relativa estabilidade na presença de beta-lactamases. Incluem-se entre as cefalosporinas da Terceira Geração a ceftaxima, a maxolactama, a cefoperazona, a ceftriaxona, a ceftizoxima, a ceftazidima e defsulodina (SILVA, 1998).

Tanto a cefalosporina quanto a penicilina inibem as enzimas que catalisam as reações de transpeptidação e carboxipeptidação durante a montagem da parede celular.



**Figura 01.** Estrutura molecular da cefalotina (1ª Geração)





**Figura 02.** Estrutura molecular da ceftriaxona (3ª Geralção)

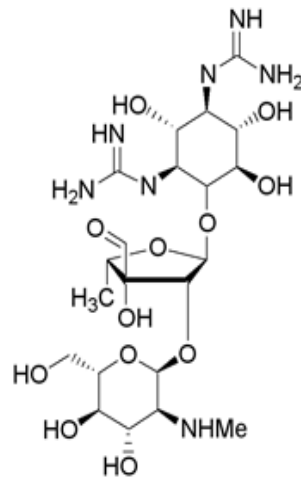
### 3.9.2 Classe Aminoglicosídeos

Os aminoglicosídeos constituem um grupo de antibióticos que se assemelham entre si quanto à atividade antimicrobiana, características farmacocinéticas e toxicidade. Todos os aminoglicosídeos são bactericidas (BARBOSA et al., 2008). Dentro do grupo se encontram os antibióticos estreptomicina, gentamicina, tobramicina, netilmicina, canamicina e amicacina (KONEMAN et al., 2001; TRABULSI et al., 2005). Os antibióticos que apresentam estrutura semelhante são canamicina, neomicina e gentamicina (TRABULSI et al., 2005). Os aminoglicosídeos são obtidos de várias espécies dos gêneros *Streptomyces* e *Micromonospora* (BLACK, 2002).

Conforme NCCLS (2003) os membros do grupo de agentes antimicrobianos estruturalmente relacionados inibem a síntese protéica bacteriana em nível ribossômico que é atribuída à inibição da síntese de proteínas. A classe inclui membros que são afetados de diferentes formas, pelas enzimas inativadoras dos aminoglicosídeos, o que resulta em algumas diferenças de espectro entre os diversos agentes. Segundo AMATO NETO & MENDONÇA (1994) os aminoglicosídeos fixam-se na subunidade 30S dos ribossomos das bactérias sensíveis, provocando alteração do código genético, com leitura incorreta, que induz a incorporação equivocada ao peptídeo de um ou mais de um aminoácido. As proteínas defeituosas que se formam exercem efeito letal para a célula bacteriana. O aminoglicosídeo pode ser ministrado com sinergismo com a

penicilina que age sobre a síntese de parede celular, facilitando a entrada dos aminoglicosídeos em tratamentos contra os estafilococos (BOMONO & SZABO, 2006).

A estreptomicina se liga à subunidade 30S do ribossomo bacteriano. A interação impede a ligação do ribossomo ao RNA mensageiro, com o consequente bloqueio da síntese de proteínas (SILVA, 1998).



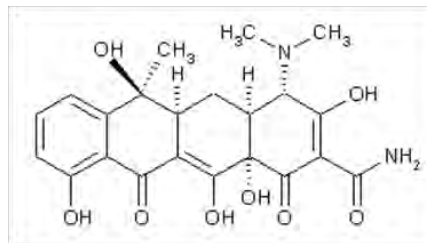
**Figura 03.** Estrutura molecular da Estreptomicina

### 3.9.3 Classe Tetraciclina

A tetraciclina é um antibiótico produzido por bactérias do gênero *Streptomyces* (BLACK, 2002), apresentam um tetra anel e apresentam diferentes grupos químicos ligados a ele (TRABULSI et al., 2005). As tetraciclinas constituem grupo de antibióticos de largo espectro. Na prática, utilizam-se as tetraciclinas de curta duração (tetraciclina) e as de longa duração (doxiciclina, minociclina) (NCCLS, 2003).

As tetraciclinas têm ação bacteriostática, inibindo síntese de proteína e pela boa difusão no interior das células são antibióticos de ótima ação contra bactérias intracelulares (TRABULSI et al., 2005). AMATO NETO & MENDONÇA (1994) comentam que as tetraciclinas se ligam à subunidade 30S dos ribossomos dos

microrganismos sensíveis impedindo a ligação dos RNA<sub>t</sub> a essas partículas e assim o acesso dos aminoácidos ao local onde ocorre a montagem das moléculas peptídicas. As drogas do grupo estão estreitamente inter-relacionadas e com poucas exceções apenas a tetraciclina precisa ser testada de forma rotineira (NCCLS, 2003).



**Figura 04.** Estrutura molecular da Tetraciclina

A resistência às tetraciclina é um mecanismo frequentemente mediado por plasmídios R que envolve uma diminuição do acúmulo do antibiótico dentro da célula bacteriana (SILVA et al., 1998). A ligação das tetraciclina à subunidade 30S dos ribossomos bacterianos são responsáveis pelo bloqueio de acesso do amino-acetil tRNA ao complexo mRNA-ribossomo no sítio acceptor com consequente inibição da síntese de proteínas nas bactérias impedindo a adição de aminoácidos ao peptídeo em crescimento (HARVEY et al., 2008).

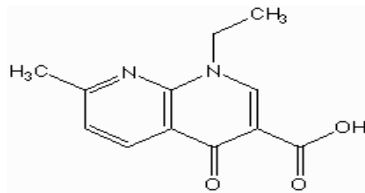
#### 3.9.4. Classe Quinolonas

A subclasse dos quinolônicos compreende os ácidos nalidíxico e oxolínico, bem como a subclasse dos florquinolônicos conhecidos como norfloxacino e a ciprofloxacina (TRABULSI et al., 2005).

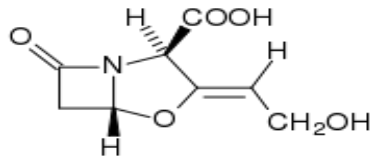
As fluoroquinolonas inibem unicamente a replicação do DNA bacteriano por interferência com a atividade da DNA girase durante o desenvolvimento e a reprodução bacteriana. A ligação da quinolona tanto à enzima quanto ao DNA para formar um

complexo ternário inibe a etapa de reassociação e, portanto, causa a morte celular por indução da clivagem do DNA (HARVEY et al., 2008).

Pequenas diferenças estruturais no núcleo das quinolonas permitem dividi-lo em quatro grupos: naftiridinas, cinolins, piridopirimidinas e quinolonas (SOUZA, 2005<sup>a</sup>). As substâncias inibem a síntese do ácido nucléico por ligação ao RNA polimerase ou inibição do DNA-girase, provocando efeito bactericida (ROSSI & ANDREAZZI, 2005).



**Figura 05.** Estrutura molecular do ácido nalidíxico.



**Figura 06.** Estrutura molecular da ciprofloxacina

### 3.10 Resistência

NASCIMENTO et al. (2005) citam que o uso de antimicrobianos, quer como medida terapêutica ou profilática deve ser visto com ressalva. Doses de antimicrobianos administradas por tempo prolongado podem desequilibrar a microbiota normal do trato gastrointestinal com repercussão no metabolismo de substâncias endógenas e exógenas

e na susceptibilidade a patógenos, como *Salmonella* sp. e *E. coli*. Podem também, desenvolver pressão sobre a microbiota indígena do trato gastrointestinal favorecendo a seleção de cepas mutantes resistentes aos antibióticos e a possibilidade de transmitir resistência a outras bactérias.

MANTILLA et al. (2008), VIEIRA et al., 2008; BORGES et al., 2008; MOTELLI & SADATSUNE, 2001, argumentam que a utilização de antimicrobianos gerou grande otimismo em relação à prevenção e ao tratamento dos processos infecciosos. Entretanto, o uso exagerado e nem sempre criterioso ou racional dos antimicrobianos e quimioterápicos trouxe dificuldades, é a maior delas representada pela progressiva resistência bacteriana ao fármaco.

As bactérias podem ser classificadas em sensíveis e resistentes aos antimicrobianos. Em geral, classificam-se como resistentes as bactérias que crescem “in vitro”, nas concentrações médias que os antimicrobianos atingem no sangue, quando administrados por via oral. São sensíveis as que não crescem nestas concentrações (NCCLS, 2003). Segundo MOTA et al. (2005) o termo resistente se refere àqueles microrganismos que não se inibem pelas concentrações habitualmente alcançadas no sangue ou tecidos do correspondente antimicrobiano, ou àqueles que apresentam mecanismos de resistência específicos para o agente estudado ao qual não havia adequada resposta clínica quando usado como tratamento. BOROWSKY et al. (2006) e BURTON & ENFELKIRK (2005) comentam que, quando a resistência é uma característica dos próprios microrganismos, é considerado como fator intrínseco e quando é mediada por plasmídios ou transposons é considerada adquirida por mutação.

A resistência aos antimicrobianos está normalmente associada a um elemento extra-cromossômico ou plasmídios, que pode ser transferido entre bactérias da mesma espécie ou de espécies diferentes. Com o uso indiscriminado de antimicrobianos, tem ocorrido seleção de amostras resistentes e rapidamente haverá toda uma população bacteriana resistente a determinado antimicrobiano (MENEZES et al., 2004).

A resistência pode ser denominada como: a) simples, quando a bactéria resiste à ação de um único antibiótico; b) múltipla, quando o mecanismo bioquímico da

resistência para um determinado antibiótico se estende também sobre outros antibióticos (RIVERA et al., 1995).

VALENTE et al. (2008) relataram que é inevitável no desenvolvimento da resistência, um estudo aprofundado sobre as bactérias patogênicas em consequência do uso clínico das drogas antimicrobianas, e que esse estudo, em conjunto com o decréscimo da taxa de oferecimento de novos grupos químicos biocidas ativos, aumentam a necessidade de saber manejar o risco do desenvolvimento de resistência, bem como responder rapidamente a sua eventual ocorrência.

A maioria dos microrganismos mostrou variação de sensibilidade aos antimicrobianos, apresentando resistência múltipla e de elevada concentração (em µg/mL), envolvendo quase todos os fármacos disponíveis para a antibioticoterapia. A variabilidade é característica de algumas bactérias altamente prevalentes, como *Staphylococcus aureus*, *S. epidermidis*, *Enterococcus faecalis* entre as Gram-positivas; Enterobactérias (*Shigella*, *Salmonella*, *E. coli*, *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Serratia*, *Proteus* etc.), *Acinetobacter* e *Pseudomonas aeruginosa* entre as Gram-negativas (VALENTE et al., 2008).

As cepas de bactérias resistentes a múltiplos antibióticos não apresentam maior potencial de transmissibilidade ou virulência quando comparadas às cepas sensíveis, entretanto, as infecções devidas a agentes multi-resistentes apresentam opção terapêutica restrita (MENEZES et al., 2004).

### **3.11 Atividade antimicrobiana de condimentos**

Há milênios, os vegetais têm sido utilizados pelos seres humanos no tratamento de doenças. Porém, apenas recentemente, as plantas tornaram-se objeto de estudo científico no que concerne às variadas propriedades medicinais, inclusive quanto à atividade antibacteriana (NOVAIS et al., 2003). Com a difusão das modernas técnicas de preservação, houve interesse acentuado e renovado sobre algumas especiarias, utilizadas principalmente como condimentos alimentares. Além de participarem como

ingredientes de inúmeros alimentos, tornando-os mais saborosos e digestivos, apresentam ação indireta e complementar como agentes antimicrobianos devido à presença de óleos essenciais (ERNANDEZ & GARCIA-CRUZ, 2007).

Várias pesquisas vêm sendo desenvolvidas e direcionadas no desenvolvimento de novos agentes antimicrobianos provenientes de plantas e outros produtos naturais, para serem aplicados em produtos alimentícios, farmacêuticos e cosméticos (SOUZA, 2000). Assim, tem-se verificado um grande avanço científico envolvendo estudos químicos e farmacológicos de plantas medicinais, visando obter novos compostos com propriedades terapêuticas. As propriedades antimicrobianas de diversas espécies vegetais têm sido reconhecidas empiricamente durante séculos, mas foram cientificamente confirmadas apenas nas últimas décadas (HAIDA et al., 2007).

Segundo MENDONÇA (2004) os condimentos possuem propriedades antimicrobianas, antioxidantes e medicinais e essas propriedades antimicrobianas dos condimentos têm despertado grande interesse devido às perspectivas de constituírem uma alternativa para as exigências dos consumidores, quanto à utilização de aditivos naturais em alimentos. O uso de metabólitos secundários de plantas vem crescendo e conquistando o mercado e a preferência dos consumidores sobre plantas, principalmente por apresentar benefícios à saúde humana, bem como menores impactos ao meio ambiente (PEREIRA et al., 2008).

Segundo MENDONÇA (2004) a tendência do mercado em utilizar produtos naturais destacam-se, dentre eles os agentes antimicrobianos naturais, extraídos de plantas como os óleos essenciais, os óleos voláteis, os óleos etéreos ou essências obtidas das partes de plantas pela destilação por arraste com vapor d'água ou outros métodos.

A deterioração de alimentos por origem microbiana é um problema constante nas indústrias alimentícias. Para contornar o problema, os fabricantes têm utilizado aditivos do tipo conservantes, com o intuito de conservar melhor e aumentar o prazo de validade de produtos alimentícios. Por outro lado, os consumidores tendem a evitar produtos que apresentem em sua composição esses conservantes de origem química devido aos seus problemas de toxicidade (DEGASPARI et al., 2005). Segundo BERTINI

et al. (2005) argumentam que o problema da resistência microbiana está aumentando e a perspectiva para o uso de drogas antimicrobianas no futuro é ainda indecisa. Portanto ações devem ser tomadas para reduzir o problema.

Além disso, a resistência de microrganismos patogênicos a múltiplas drogas tem aumentado devido ao uso indiscriminado de antimicrobianos. Essa situação tem forçado os cientistas à busca de novas drogas (NOVAIS et al., 2003). Assim os mesmos autores comentam que com os estudos já realizados, os vegetais são uma excelente fonte de busca das novas drogas antimicrobianas, tendo em vista que as diversidades moleculares dos produtos naturais apresentam dados muito superiores àquela derivada dos processos de síntese química.

Para detectar as substâncias são utilizados vários métodos, que se diferenciam na sensibilidade ou em seus princípios. Os resultados obtidos serão influenciados pelo método escolhido, assim como pelos microrganismos usados nos testes. A parte da planta utilizada também interfere nos resultados bem como a forma de uso (CARVALHO et al., 2006).

### **3.12 Especiarias**

Plantas aromáticas/condimentos ou ainda as chamadas especiarias, são usadas em alimentos com fins aromatizantes, tendo identificada à atividade antibacteriana, podem também ser usadas como conservantes de alimentos (CARVALHO et al., 2006).

Especiarias são conceituadas como vegetais possuidores de substâncias aromáticas ou picantes de origem tropical, usadas para dar sabores e odores aos alimentos, incluindo folhas, caules, flores e germinações, bulbos, rizomas e outras partes das plantas (NASCIMENTO et al., 2007; SOUZA et al., 2005<sup>a</sup>).

As especiarias são usadas na culinária, conferindo-lhe sabor e aroma, não tendo, a maior parte delas, qualquer valor nutritivo (ESQUIVEL, 2001). Por possuírem características especiais, como presenças de substâncias aromáticas apresentam funções não apenas por realçar o sabor ou dar gosto especial aos alimentos, mas também desempenham um importante papel na digestão do homem,



desde que usado corretamente, promovendo maior salivacão, secreção mais abundante das glândulas digestivas e aumento do peristaltismo intestinal, facilitando, assim, a degradação do alimento até a fase final (CORREIA et al. 2000).

Os componentes provedores de sabores existentes nas especiarias consistem de compostos como alcoóis, ésteres, aldeídos, terpenos, fenóis, ácidos orgânicos e muitos outros elementos, que não têm sido totalmente identificados (SAGDIÇ, 2003).

Por definição, condimentos e especiarias são produtos aromáticos de origem vegetal empregados principalmente para conferir sabor aos alimentos. Segundo SOUZA et al., 2004, além dessa utilidade, os condimentos possuem também propriedades antimicrobianas, antioxidantes e medicinais. Segundo BERTINI et al., (2005), vários estudos com óleos essenciais de plantas vêm apresentando uma atividade antimicrobiana contra um grande número de bactérias incluindo espécies resistentes a antibióticos e antifúngicos.

As propriedades antimicrobianas dos condimentos e de seus óleos essenciais têm sido estudadas principalmente com relação ao efeito inibidor de microrganismos patogênicos presentes em alimentos (SOUZA et al., 2004). Assim, dentro do grupo das especiarias neste trabalho foram estudados o orégano e a salsinha, temperos essenciais do queijo Minas Frescal temperado na região do Triângulo Mineiro.

### 3.12.1 *Origanum vulgare* L. (orégano)

O orégano, conhecido cientificamente como *Origanum vulgare* L., pertence à família *Lamiaceae*. É uma planta perene, têm entre 25 – 40 cm de altura, folhas opostas, ovais, verde-escuras, pecioladas inteiras ou serrilhadas, com aproximadamente 35 mm de comprimento (TERAMOTO et al., 2009).

A família *Lamiaceae* compreende 150 gêneros com cerca de 2.800 espécies distribuídas em todo o mundo, sendo o maior centro de dispersão a região do Mediterrâneo. As suas propriedades terapêuticas são conhecidas desde os tempos mais antigos, assim muitas das espécies introduzidas no Brasil são plantas medicinais e produtoras de óleos essenciais, sendo utilizadas também como condimentos ou como

flores ornamentais. Dentre os gêneros cultivados, destacam-se várias espécies usadas como condimentos, tais como: erva-cravo (*Hyptis*), alfavaca (*Ocimum*), alecrim (*Rosmarinus*), hortelã-pimenta (*Mentha*), manjericão (*Origanum*), manjerona (*Majorana*), basilicão (*Basilicum*), orégano (*Origanum*), tomilho (*Thymus*) e erva-cidreira (*Melissa*). Outras são cultivadas como flores ornamentais ou para produção de óleo essencial, como: sálvia (*Salvia*), alfazema (*Lavandula*) e patchuli (*Pogostemum*) (PORTE & GODOY, 2001).

A presença e detecção de cepas de microrganismos patogênicos resistentes a antimicrobianos em alimentos é estudada no campo da microbiologia de alimentos, e tem despertado grande preocupação no setor de Saúde Pública.

Em estudos de cunho científico, as especiarias e seus produtos derivados (extratos, óleos essenciais constituintes químicos) têm sempre mostrado resultados satisfatórios na inibição de microrganismos patogênicos oportunistas, patógenos primários, deteriorantes e/ou na inibição da produção de toxinas microbianas (SOUZA et al., 2005<sup>b</sup>). A utilização de óleos essenciais para a conservação de alimentos vem sendo muito estudada, principalmente os obtidos de especiarias, como os óleos de cravo da Índia, orégano e manjericão. O valor condimentar de uma planta está quase sempre associado ao teor de óleos essenciais, que são compostos químicos, gerados durante o desenvolvimento da planta (SOUZA et al., 2004).

Em vários estudos, tem sido evidenciado que os princípios ativos dos condimentos localizam-se na fração de óleo essencial (YANO et al., 2006). Os óleos essenciais das espécies de condimentos contêm diferentes compostos, que contribuem com as propriedades antimicrobianas (SOUZA et al., 2004). Segundo TERAMOTO et al (2009) a composição química do óleo de orégano pode obter-se o carvacrol, um composto fenólico, sendo o componente majoritário do óleo essencial de orégano e principalmente responsável pela imensa atividade antimicrobiana de tal produto além de compostos como borneol, cineol, terpineol, cimeno, mírceno, sabineno, tujona, cariofileno, germacreno, espatulenol, eucaliptol, linalol, bornilacetato, bisaboleno, cadineno, timol, entre outros muitos componentes. A composição química dos produtos de origem vegetal, tais como óleos essenciais e extratos dependem de vários fatores de

ordens climáticas, sazonais, geográficos, bem como de períodos de colheitas do vegetal e técnicas de obtenção do produto derivado (SOUZA et al., 2005<sup>b</sup>).

Estudos realizados por diversos autores relacionaram a estrutura química e a atividade antimicrobiana dos componentes principais dos óleos essenciais demonstrando não haver diferença na atividade antimicrobiana com a variação do número de duplas ligações, nem com a presença de uma radical cetona no núcleo aromático de tais compostos. Entretanto, verifica-se que a introdução de uma hidroxila nesse núcleo resulta em aumento na atividade antimicrobiana. O eugenol, timol, carvacrol, isobemelo, vanilina e o aldeído salicílico são compostos que apresentam a hidroxila ligada ao anel ciclohexano e estão entre os mais potentes agentes antimicrobianos encontrados nos condimentos (TERAMOTO et al., 2009). PEREIRA et al. (2008) comentam que os princípios ativos do orégano o timol (5-metil-2-(1-metil)) e o carvacrol (2 metil-5-(1-metil)), provocam distorção na estrutura física da célula, causando expansão e conseqüente desestabilidade na membrana, modificando a permeabilidade, desnaturando enzimas essenciais e alterando a força próton motora, por meio de variações no pH e potencial elétrico. KIM et al. (1995) evidenciaram que o cravacol mostrou forte poder bactericida contra os cinco microrganismos testados (*E. coli*, *E. coli* O157:H7, *Salmonella typhimrium*, *L. monocytogenes* e *Vibrio vulnificus* na concentração de 250µg/ml).

Os óleos essenciais encontram sua maior aplicação biológica como agentes antimicrobianos. Esta capacidade, presente na grande maioria dos compostos, de certa maneira, representa uma extensão do próprio papel que exercem nas plantas, defendendo-as de bactérias e fungos fitopatogênicos (TERAMOTO et al., 2009).

Ao observar o relato na literatura científica abordando o estudo do potencial antimicrobiano de especiarias, nota-se que o orégano (*Origanum vulgare* L.) tem sempre apresentado resultados de destaque como agente hábil de inibição de bactérias e fungos contaminantes de alimentos (SOUZA et al., 2005<sup>a</sup>).

### 3.12.2 *Petroselinum sativum* L (salsinha)

Muito estimada pelos gregos, a salsa era utilizada para coroar os vencedores dos jogos e para decorar túmulos, visto que estava associada a Arquemorus, o arauto da morte. A salsinha é originária da Europa e Oriente Médio e pertence à família *Apiaceae* (*Umbelliferae*). Hoje, seu consumo está disseminado pelo mundo todo. No Brasil, foi introduzida pelos primeiros colonizadores portugueses. É usada como condimento e/ou elemento decorativo de vários pratos. O *Petroselinum sativum* L tem o nome popular de cheiro, salsa das hortas, salsa de cheiro, salsa cultivada, cheiro verde, salsinha e salsa hortense. O óleo essencial de salsinha é rico em diapiol, pineno, apiol, miriscitina e apiina.

Nos últimos anos, tem sido dada ênfase à pesquisa de possíveis antioxidante presentes em produtos naturais, com destaque para as especiarias, mundialmente utilizadas para fins culinários (GUERRA & LAJOLO, 2005). Segundo os mesmos autores, a atividade antioxidante das especiarias e de seus extratos é atribuída aos compostos fenólicos que também podem atuar como sequestrantes de radicais livres no organismo reduzindo os riscos de doenças crônicas.

Segundo ZHANG et al., (2006) o óleo essencial de *Petroselinum sativum* mostraram atividade antioxidante com a presença de miristicina e apiol. ADSERSEN et al., (2006) citaram que o extrato aquoso e metanólico são eficientes no tratamento da disfunção da memória enquanto Al-HOWIRINY et al. (2003), citaram que o extrato etanólico apresenta presença de taninos, flavonóides, esteróis e triterpenos que se destacam como antiulcerativos.

Em estudos com antimicrobianos encontrou apenas o de FLORES et al. (1999) que provaram que *Petroselinum sativum* inibe o crescimento da *Shigella flexineri*.

## IV MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 Obtenção de amostras

Foram adquiridas 111 amostras de queijo Minas Frescal de 111 produtores diferentes, sendo que 30 amostras foram de queijos produzidos com leite pasteurizados com Sistema de Inspeção Federal (SIF) de laticínios com registro; 50 amostras de queijos produzidos com leite cru (sem SIF) de produção caseira vendidos no comércio; e 31 amostras de queijo sem SIF temperados com especiarias. Todas as amostras foram coletadas aleatoriamente em diferentes estabelecimentos comerciais da região do Triângulo Mineiro (Apêndice 01), no período de março de 2007 a dezembro de 2007. As amostras foram coletadas com assepsia em sua embalagem plástica original e transportadas sob refrigeração em caixas de isopor com gelo artificial ao Laboratório de Microbiologia de Alimentos, em Uberaba.

### 4.2 Preparo das amostras

Todos os procedimentos utilizados no preparo das amostras seguiram as recomendações descritas no Compendium of Methods for the Microbiological Examinations of Foods (VANDERZANT & SPLITTSTOESSER, 1992). As embalagens foram desinfetadas com álcool 70% e abertas com tesoura esterilizada. O queijo foi todo picado em uma placa de Petri esteril com auxílio de uma faca e colher esterilizadas. Estas amostras foram maceradas em cápsulas esterilizadas de porcelana com auxílio de pistilo para maior homogeneização. Foram retiradas da cápsula 25 gramas de cada amostra e colocadas em erlenmeyer, contendo 225 ml de água peptonada esteril, homogeneizou-se por 2 min a amostra considerando este a diluição  $10^{-1}$ . A segunda e a terceira séries continham nove ml de água peptonada e receberam 1 ml das diluições  $10^{-1}$  e  $10^{-2}$ , respectivamente (SILVA et al., 2007; VANDERZANT & SPLITTSTOESSER, 1992).

### 4.3 Análises Microbiológicas

#### 4.3.1 Técnica de Tubos Múltiplos

Após selecionar as três diluições, inoculou-se um ml da diluição em uma série de três tubos contendo caldo Lauril Sulfato Triptose (LST) (OXOID CM 451 -Apêndice 2). Os tubos LST foram incubados a 35° C por 24 horas e observou-se o crescimento com produção de gás. Em caso positivo, transferiu-se uma alçada em tubo contendo nove mL de Verde Bile Brilhante (VB) (OXOID CM 31 - Apêndice 2) e outra alçada em cinco mL de caldo *E.coli* Medium (EC) (MERCK 10765). Os tubos VB foram incubados a 35°C por 24 horas e determinou-se o número de tubos positivos com gás para confirmação de coliformes a 35°C. Já os tubos EC foram incubados a 45°C em banho-maria por 24 horas para confirmação da presença de coliformes a 45°C (SILVA et al., 2007).

De cada tubo de EC positivo com produção de gás, estriou-se uma alçada em placa contendo Ágar Eosina Azul de Metileno (EMB) (Apêndice 2) sendo as mesmas incubadas a 35° C por 24 horas, e posteriormente foi observado se houve desenvolvimento de colônias nucleadas com centro preto, com ou sem brilho metálico. Havendo colônias típicas, foram transferidas 10 colônias bem isoladas em tubo contendo Ágar Triptona de Soja (TSA) inoculando a 35° C por 24 horas.

#### 4.3.2 Identificação bioquímica das *Enterobacteriaceae*

A aplicação de metodologia foi baseada em provas específicas (identificação bioquímica), para confirmar a presença das *Enterobacteriaceae*, tendo em vista assegurar a identificação das bactérias, aliando-se segurança e maior rapidez na obtenção de informações sobre a presença ou não da *E. coli* como indicador de contaminação fecal de forma particularizada nas amostras de queijo Minas Frescal.

A identificação bioquímica das *Enterobacteriaceae* foi realizada utilizando-se as provas: Tríplice Agar Ferro (TSI – MERK 3915), Ágar Citrato de Simmons (MERCK 2501), Indol (Meio SIM, MERCK 5470), Vermelho de Metila, Teste de Voges –

Proskauer (MEIO MR-VP – MERCK 5712), Ureia de Christensenm (OXOID CM 53) e Fenilalanina desaminase (MICROMED 2022) (Apêndice 02).

#### **4.4 Técnica de aglutinação em lâmina**

Para a técnica de aglutinação em lâmina, utilizou-se lâmina limpa e desengordurada com álcool. A suspensão bacteriana usada era suficientemente espessa onde se suspendeu o crescimento da superfície do meio 2x LB (Apêndice 2) em 0,2 a 0,3 ml de solução salina. A proporção suspensão/anti-soro era de uma alçada para uma gota normal dos soros PROBAC, seguindo a técnica utilizada por ÁVILA et al. (1988).

A mistura suspensão/anti-soro foi totalmente homogênea e ocupou uma área de 1,5 cm de diâmetro. Movimentando a lâmina de modo que a mistura suspensão/anti-soro se desloque facil e continuamente. A movimentação foi mantida pelo menos por 1 a 2 minutos.

#### **4.5 Extração de DNA Template**

O DNA microbiano foi extraído de todas as amostras isoladas segundo a técnica proposta por KESKIMAKI et al., (2001). As 330 colônias isoladas de *E. coli* foi semeada por 12 horas em um tubo de ensaio contendo um ml de meio LB. O volume foi transferido para um microtubo e centrifugado a 10.000 rpm por um minuto para a precipitação das células e descarte do sobrenadante. As células precipitadas foram ressuspensas em 250 µl de água MilliQ estéril e agitou-se em vortex por 30 segundos. A cultura bacteriana foi novamente precipitada e repetiu-se o processo de lavagem. Após duas lavagens com água MilliQ, o microtubo contendo as células foi colocado por 10 minutos em água fervente (100°C). Após esse tempo, as células foram precipitadas através de centrifugação a 14.000 rpm durante 30 segundos. Do sobrenadante foi retirada uma alíquota de 150 µl, a qual foi transferida para outro microtubo. Em seguida,

o material foi estocado em freezer a  $-20^{\circ}\text{C}$  até o momento de uso. O material foi denominado DNA molde (DNA template) e foi utilizada como fonte de DNA na reação em cadeia de polimerase (PCR).

O sobrenadante foi utilizado na reação de PCR para determinação dos genes de virulência (*stx1*, *stx 2* e *eae*) e dos três operons fimbriais *pap*, *afa* e *sfa*.

#### **4.6 Determinação do Gene de Virulência (*stx1*, *stx2* e *eae*)**

As determinações dos genes de virulência *stx1*, *stx2* e *eae* foram realizadas conforme CHINA et al. (1996) e a sequência de bases (primers) e o tamanho dos segmentos específicos dos genes *stx1*, *stx2* e *eae* amplificados estão apresentados na Tabela 01.

Os primers utilizados foram adquiridos da IDT (Integrated DNA Technologies, Inc). A amplificação do DNA bacteriano foi realizada em 50 $\mu\text{l}$  contendo quatro  $\mu\text{l}$  de amostra do sobrenadante, 0,5  $\mu\text{l}$  de cada primer (total 3,0  $\mu\text{L}$ ), 0,2mM (cada) dATP, dGTP, dCTP, dTTP, 10mM Tris-HCl (pH 8,3), 1,5 mM  $\text{MgCl}_2$ , 50 mM KCl e 1,5U de Taq polimerase (Biol). A mistura foi submetida a uma termociclagem (termociclador Eppendorf Mastercycler) a  $94^{\circ}\text{C}$  por cinco minutos (desnaturação) seguidos de 30 ciclos de  $94^{\circ}\text{C}$  por 1 minuto (desnaturação),  $55^{\circ}\text{C}$  por 1 minuto (anelamento) e  $72^{\circ}\text{C}$  por 1 minuto (extensão). No último ciclo, a última fase foi realizada por um tempo maior (10 minutos) para a completa extensão pela Taq polimerase. Foi utilizada como controle a cepa EDL 933 (O157:H7, *stx1*, *stx2*, *eae*) e DH5 $\alpha$  (controle negativo).



**Tabela 01.** Primers utilizados na reação de PCR para amplificação dos fragmentos específicos dos genes *stx1*, *stx2* e *eae*.

Primers	Sequência de nucleotídeos	Tamanho do produto de amplificação (pb)
eae B52	AGGCTTCGTCACAGTTG	570
eae B53	CCATCGTCACCAGAGGA	
stx1 B54	AGAGCGATGTTACGGTTTG	388
stx1 B55	TTGCCCCCAGAGTGGATG	
stx2 B56	TGGGTTTTTCTTCGGTATC	807
stx2 B57	GACATTCTGGTTGACTCTCTT	

#### 4.7 Amplificação dos operons fimbriais (*pap*, *afa*, *sfa*)

Foram utilizados três jogos de primers sintetizados pela Invitrogen. Cada um dos jogos de primers foi utilizado para amplificação de um dos três operons fimbriais estudados, *pap*, *afa*, *sfa*. O PCR foi realizado em um volume de 50 µl contendo 10 µl do DNA template, 0,5 µM de cada dos primers, 200 µM de cada um dos quatro deoxinucleotideo trifosfato, 10mM Tris HCL ( pH 8,3) 1,5 M Mg Cl<sub>2</sub> e 2U de Taq polimerase (Biotol). A amplificação por PCR consistiu de um ciclo inicial de desnaturação de 94°C por 5 minutos seguidos por 25 ciclos de desnaturação a 94°C por 2 minutos, anelamento a 65°C por 1 minuto, extensão a 72°C por 2 minutos e um ciclo final de extensão a 72°C por 10 minutos segundo o protocolo estabelecido por LE BOUGUENEC et al. (1992).

Após um dos dois processos de amplificação 10µl da mistura de amplificação foram analisados por eletroforese em gel de agarose de 1,5%, e os produtos da reação foram visualizados após marcação com brometo de etídio. Um controle da reação (branco), o qual continha todos os componentes da mistura de reação exceto o DNA molde, foi incluído em cada reação do PCR.

**Tabela 02.** Primers utilizados na reação de PCR para amplificação dos fragmentos específicos dos genes *pap*, *sfa*, *afa*.

Primers	Sequência de nucleotídeos	Tamanho do produto de amplificação (pb)
pap1	GACGGCTGTACTGCAGGGTGTGGCG	328
pap 2	ATATCCTTTCTGCAGGGATGCAATA	
sfa 1	CTCCGGAGAACTGGGTGCATCTTAC	410
sfa 2	CGGAGGAGTAATTACAAACCTGGCA	
afa 1	GCTGGGCAGCAAACCTGATAACTCTC	750
afa 2	CATCAAGCTGTTTGTTCGTCCGCCG	

#### 4.8 Amplificação através da Técnica PCR

A análise dos produtos obtidos após a PCR foi feita por meio de eletroforese em gel de agarose a 1,5% em cubas de diferentes tamanhos mantendo as seguintes proporções: 5µL de brometo de etídio (1 mg/mL) e 1,5 g de agarose para cada 100 mL de tampão TAE. Inicialmente, a quantidade de agarose (SIGMA) foi pesada e transferida para um erlenmeyer, no qual foi adicionado o tampão TAE, completando o volume adequado. A mistura foi aquecida em forno micro-ondas até que a agarose estivesse completamente dissolvida no tampão. Após o resfriamento da mistura, foi acrescentado o brometo de etídio. O brometo de etídio é um agente intercalante do DNA, que permite a visão deste quando exposto à luz ultravioleta. O gel, ainda em estado líquido foi vertido sobre um suporte de acrílico contendo um ou dois pentes. Depois de solidificado, o gel foi colocado dentro da cuba de eletroforese, preenchida com tampão TAE. Os pentes foram retirados do gel, deixando presentes vários canaletas, nas quais foram aplicadas as amostras e um marcador de peso molecular (DNA do vírus  $\phi$ X 174 digerido com HaeIII Pharmacia Bioscience). As amostras, antes de serem aplicadas no gel, foram acrescidas de 1/6 do volume final do tampão de carregamento para que as amostras ficassem mais densas que o tampão da cuba, o que permite que elas se depositem nas canaletas. A cuba foi ligada a uma fonte de corrente elétrica, fazendo com que o DNA, molécula carregada negativamente, migre

em direção ao pólo positivo. Neste processo, fragmentos de DNA com diferentes pesos moleculares, migram em diferentes velocidades, fazendo com que ele se separe no gel.

Após a separação eletroforética (85 volts por 1 hora), o gel foi exposto em um transluminador, e exposto de luz ultravioleta. O gel foi fotografado (filme Kodak plus X125) e o tamanho dos fragmentos de DNA das amostras inferido por comparação com o marcador de peso molecular utilizado (STELLA et al., 2008).

#### **4.9 Teste de Suscetibilidade a Antimicrobianos**

Foi isolado e identificado um total de 1.243 estirpes de *E. coli* nos queijos analisados. Para realização do teste de susceptibilidade a antimicrobianos, foram separadas aleatoriamente 330 estirpes, sendo que 90 foram de queijos com SIF, 150 de queijo sem SIF e 90 de queijo temperado.

Como teste fenotípico de tipagem bacteriana, foi realizado o teste de susceptibilidade a antimicrobianos dos 330 isolados, usando a técnica de difusão em placas, segundo NCCLS (2003). Para a realização dos testes, as cepas de *E. coli* foram repicadas em placas contendo agar Mueller Hinton (MH) (OXOID CM 337) e incubadas a 37° C por 18 a 20 horas. O inóculo foi preparado pelo método de suspensão direta. Com auxílio de uma alça bacteriológica, três a quatro colônias da bactéria foram suspensas em solução salina estéril. Para acertar a turbidez da suspensão, foi comparado com padrão 0,5 da escala de MacFarland, em espectrofotômetro a 580 nm. A seguir, as culturas diluídas foram semeadas com o auxílio de *swabs* estéreis, em placas contendo ágar Mueller-Hinton (OXOID CM 337) e, após aproximadamente três minutos, tempo necessário para a secagem da superfície do meio foram colocados os polidiscos contendo os antimicrobianos (KONEMAN et al., 2001; OLSVIK & STROCBINE, 1993).

#### **4.10 Antimicrobianos testados**

Os discos testados foram divididos em quatro grupos: Grupo A - Cefalosporinas: cefalotina (CFL 30), ceftriaxona (CRO 30); Grupo B - Aminoglicosídeos: estreptomicina (EST 10), amicacina (AMI 30) e gentamicina (GEN 10), Grupo C - Quinolonas: ácido nalidíxico (NAL 30), ciprofloxacina (CIP 5) e Grupo D - outros: tetraciclina (TET 30) e sulfametoxazol + trimetoprim (SUT 25).

As placas foram incubadas a 37° C por 16 a 18 horas e a leitura do diâmetro dos halos de inibição foi através da medida dos diâmetros obtidos em milímetros. Para interpretar os resultados, foram utilizadas tabelas do NCCLS (2003), para padronizar em milímetros para disco de difusão. Com relação à distribuição à suscetibilidade aos antimicrobianos testada, os resultados foram determinados a partir da mensuração do tamanho da zona de inibição com um halômetro e na classificação das cepas em sensível (S), intermediário (I) ou resistente (R) de acordo com o diâmetro da zona padrão estabelecido na tabela para cada antimicrobiano (NCCLS, 2003).

#### **4.11 Produção de queijos Tipo Minas Frescal**

Com a finalidade de verificar o efeito das especiarias orégano e salsinha sobre os coliformes a 35°C e a 45°C, foram realizados dois experimentos, um com leite cru e outro com leite cru acrescido *E. coli* ATCC 25922, na proporção de 10 ml (concentração de 10<sup>8</sup> UFC) para 20 litros de leite cru para a produção do queijo. Os dois experimentos tiveram os mesmos quatro tratamentos: G1 a produção de queijos sem tempero, considerado controle; G2 queijos com adição de 1% de orégano desidratado; G3 queijo com 1% de folhas de salsinha crua e G4 queijos com 0,5% de orégano acrescido de 0,5% de salsinha crua. Para ambos os experimentos foram adotado o delineamento inteiramente causalizado, com 10 repetições.

### **a) Queijo controle**

Os queijos “tipo Minas Frescal” foram elaborados de forma artesanal, seguindo a técnica utilizada por pequenos produtores do estado de Minas Gerais, descrito a seguir:

O leite foi depositado na panela e aquecido até atingir a temperatura de 36° C. Desligou a chama e adicionaram-se os ingredientes, distribuindo de forma uniforme sobre o leite mexendo por um minuto para a adição do coalho. Após a adição do coalho, deixou-se o leite em repouso por um período de 30 a 40 minutos, verificando a formação de uma coalhada lisa, firme, compacta. Com o auxílio de uma faca, realizaram-se cortes paralelos e cruzados pela extensão da panela, numa distância de uns três centímetros entre um e outro corte. Após o corte, deixou-se em repouso a massa por cinco minutos. Após o repouso, iniciou-se a mexedura, com movimentos circulares e lentos, por toda a extensão e profundidade da panela. À medida que a massa foi se firmando, mais soro foi expulso de seu inferior e a massa foi ficando mais rígida.

O ponto do queijo ocorreu após 20 a 30 minutos a partir do momento do corte. A massa mais firme depositou-se com facilidade no fundo da panela e apresentou-se rígida. A massa foi então colhida com auxílio de uma concha e depositada na forma. Após a enformagem, deixou-se em repouso por 10 minutos e fez-se a viragem do queijo, passando para outra forma, com objetivo de dar acabamento à superfície que não ficou em contato direto com a forma (BEHMER, 1999).

### **b) Queijos temperados**

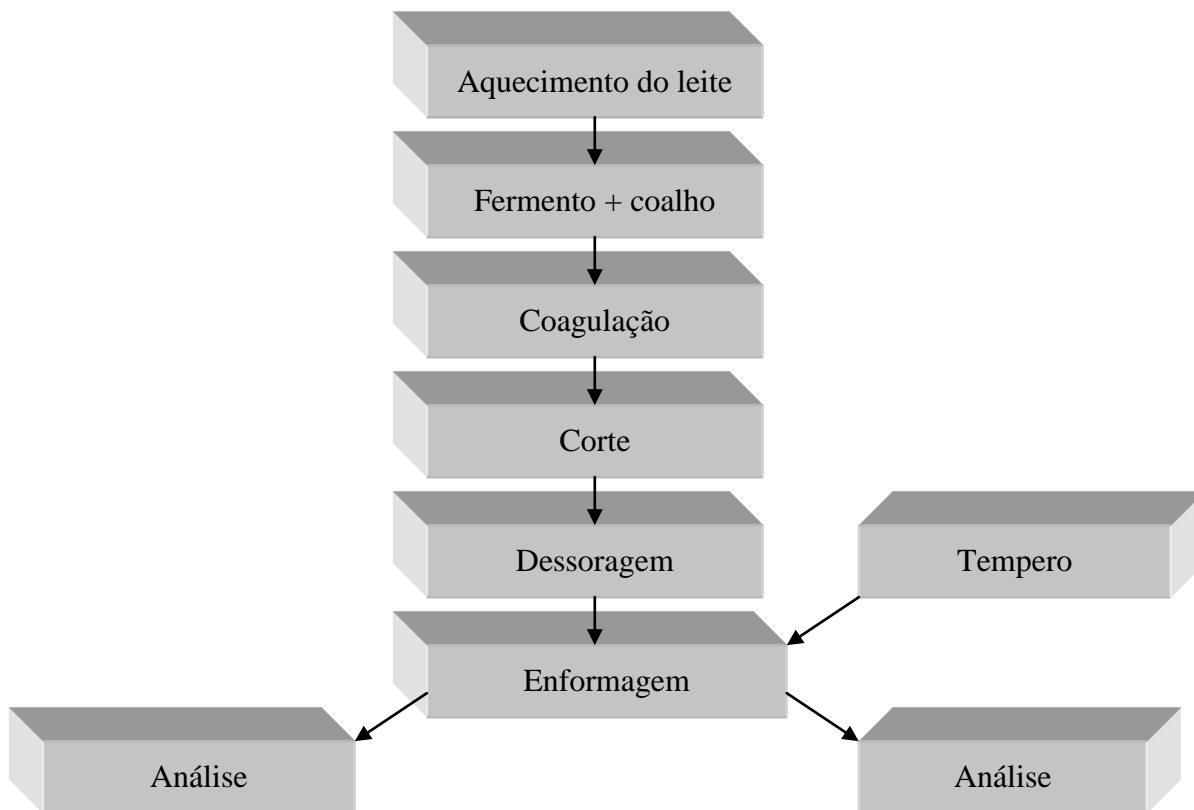
Antes da enformagem, retirou-se metade da quantidade de soro. Dividiu-se a massa em quatro grupos, onde cada grupo teria massa suficiente para produzir 10 queijos iguais de 100 g cada. Em seguida, pesou-se o condimento desejado (1% orégano, 1% salsinha e 0,5% de orégano e 0,5% de salsinha). O primeiro grupo considerado controle não foi acrescentado nenhum condimento, o segundo grupo misturou-se à massa 1% de orégano seco; o terceiro grupo 1% de salsinha lavada e

sanitizada com 1% de hipoclorito de sódio por 15 min; e o quarto grupo 0,5% de orégano seco com 0,5% de salsinha lavada e sanitizada. Todos então foram enformados normalmente em formas adequadas (modificado de BEHMER, 1999).

Ao fim do processamento, os queijos foram mantidos em embalagens plásticas originais foram acondicionados em recipientes isotérmicos, contendo gelo e transportados até a unidade laboratorial onde foram submetidos às análises microbiológicas.

#### 4.12 Fluxograma do queijo Tipo Minas Frescal

A Figura 07 apresenta um fluxograma simplificado do processo tecnológico de obtenção dos queijos analisados neste estudo (modificado de BEHMER, 1999).



**Figura 07.** Fluxograma da produção artesanal do queijo Minas Frescal (modificado de BEHMER, 1999). 4.13 Amostras bacterianas

O Ministério da Saúde recomenda especificamente para a indústria de alimentos, que os antimicrobianos sejam confrontados principalmente para o gênero *E. coli*. Assim foi analisado o efeito das especiarias orégano (*Origanum vulgare*) e a salsinha (*Petroselinum sativum*) na *E. coli* (ATCC 25922). Para cada experimento, as bactérias foram cultivadas em caldo BHI (OXOID CM-375) (Apêndice 02) com 18 a 24 horas de incubação aeróbia a 37° C, com uma concentração mínima de 10<sup>8</sup> UFC/mL. Após o tempo de incubação, acrescentaram-se 10 ml da bactéria em 20 litros de leite cru para produzir 40 queijos minas frescal da segunda parte do trabalho.

#### **4.14 Contagem de coliformes a 35°C e a 45°C – Técnica Spread Plate**

Semeou-se 0,1 ml de cada diluição (10<sup>-1</sup>, 10<sup>-2</sup> e 10<sup>-3</sup>) em placa de Petri contendo 25 ml de meio de cultura Cromocult Agar (MERCK 1.10426.0500) espalhando a cultura com a alça de Drigalsky. Em seguida incubou as placas a 37°C por 24 horas (SILVA et al., 2007).

#### **4.15 Fórmula do cálculo da eficiência (CE)**

$$CE = \frac{\text{UFC (média controle)} - \text{UFC (média amostra)}}{\text{UFC (média controle)}} \times 100 = \%$$

#### **4.16. Análises estatísticas**

Foram realizadas através distribuições absolutas e percentuais para as variáveis nominais e as medidas estatísticas: valor mínimo, valor máximo, média geometria e mediana para as variáveis numéricas (Número de coliformes a 35°C e a 45°C), utilizou-se a análise de variância, o teste de média (teste de Tukey) e o teste de qui-quadrado (não paramétrico).

Para verificar os quatro grupos de amostragem, onde o grupo 1 foi grupo controle (G1), grupo 2 o grupo acrescido de 1% de orégano (G2), grupo 3 o grupo acrescido de 1% de salsinha crua (G3) e o grupo 4 o grupo acrescido de 0,5% de orégano mais 0,5% de salsinha (G4), foram desenvolvidas através do teste não paramétrico de Kruskal-Wallis (KW), normalidade de *Lilliefors* e teste paramétrico de comparação múltipla ANOVA. Todos os testes estatísticos foram realizados no programa Bioestat5.



## V RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na Tabela 03, são apresentados valores médios aritméticos do Número Mais Provável (NMP/g) de coliformes a 35°C e coliformes a 45°C de 30 amostras de queijo Minas Frescal (Apêndice 03a), produzidos em pequenos Laticínios da Região do Triângulo Mineiro (com SIF), 50 amostras de queijo Minas (Apêndice 03b) produzidos em pequenas propriedades da Região do Triângulo (sem SIF) e 31 amostras foram de queijo temperado com especiarias (Apêndice 03c).

**Tabela 03.** Resultados da média aritmética das contagens de coliformes a 35°C e coliformes a 45°C efetuadas em queijos Minas “Frescal” produzidos na região do Triângulo Mineiro.

Parâmetros analisados	Coliformes a 35° C (NMP/g)			Coliformes a 45° C (NMP/g)		
	Com SIF	Sem SIF	Temperado	Com SIF	Sem SIF	Temperado
Queijos						
Média aritmética	6,4x10 <sup>2</sup> a	1,0x10 <sup>3</sup> b	8,5x10 <sup>2</sup> b	3,7x10 <sup>2</sup> a	8,4x10 <sup>2</sup> b	5,4x10 <sup>2</sup> a
Desvio Padrão	5,3x10 <sup>2</sup>	1,8x10 <sup>2</sup>	4,1x10 <sup>2</sup>	4,9x10 <sup>2</sup>	4,2x10 <sup>2</sup>	5,0x10 <sup>2</sup>
C V.	83%	17,5%	48,8%	131,2%	50,8%	92,6%

CV = coeficiente de variação

a, b Letras diferentes denotam diferenças significativas.

Os resultados das análises de coliformes a 35°C indicaram valores médios de 6,4x10<sup>2</sup> NMP/g para queijo com SIF, 1,0x10<sup>3</sup> para queijo sem SIF e 8,5x10<sup>2</sup> NMP/g para queijo temperado. Atualmente não há um limite máximo determinado legalmente para coliformes a 35°C. Os microrganismos são indicadores da qualidade higiênico-sanitária dos alimentos, mas em número elevado podem deteriorar o produto além de indicar condições higiênicas de produção precárias (SILVA et al., 2006). HOFFMANN et al. (2004), advertem que altas contagens de coliformes a 35° C geralmente indicam contaminação pós-processamento, limpeza e sanitização inadequadas ou o conjunto destes fatores.

Conforme os resultados apresentado na Tabela 04, obtém-se o resultado da análise de variância. Ao nível de significância de 5% o valor de F na tabela com 2 e 108

graus de liberdade é 3,15. Como o valor obtido foi maior do que 3,14, conclui-se que as médias não são iguais, ao nível de significância de 5%.

**Tabela 04.** Análise de Variância das médias aritméticas dos coliformes a 35° C.

<b>Causa da variação</b>	<b>GL</b>	<b>F</b>	<b>F (tabela)</b>
Tratamentos	2	68,17	3,15
Resíduos	108		
Total	110		

Com relação aos coliformes a 45°C, a Tabela 03 indica valores médios de  $3,7 \times 10^2$  NMP/g para queijo com SIF,  $8,4 \times 10^2$  para queijo sem SIF e  $5,4 \times 10^2$  NMP/g para queijo temperado. Segundo a Tabela 05, observou-se que a nível de significância de 5% o valor de F obtido foi de 126,93, assim conclui-se que as médias não são iguais, ao nível de significância de 5%.

**Tabela 05.** Análise de Variância das médias aritméticas dos coliformes a 45° C.

<b>Causa da variação</b>	<b>GL</b>	<b>F</b>	<b>F (tabela)</b>
Tratamentos	2	126,93	3,15
Resíduos	108		
Total	110		

Para comparar as médias de tratamentos, utilizou o teste de Tukey (Apêndice 4). Observando que o valor absoluto da diferença entre o queijo com SIF e queijo sem SIF e o queijo sem SIF e queijo temperado são maiores do que a respectiva d.m.s., conclui-se que o queijo com SIF e o queijo temperado é diferente do queijo sem SIF ao nível de significância de 5%.

A finalidade de se avaliar a carga microbiana de microrganismos indicadores dos alimentos é importante porque é através da manutenção da sua padronização que se induz a Proteção da Saúde do Consumidor. Os gastos com consultas e hospitalização,

em casos mais graves, seriam diminuídos se, uma vez conhecida a existência e distribuição dos microrganismos investigados, pode-se colher subsídios para sua minimização ou eliminação nos alimentos sob estudo (NASCIMENTO & NASCIMENTO, 2000).

Quanto às análises microbiológicas, constatou-se que grande parte dos queijos, especialmente aqueles fabricados com leite cru (70%) seguido do queijo temperado (61,4%) estavam fora dos padrões exigidos pela legislação no tocante à comercialização. Quanto aos queijos elaborados com leite pasteurizado (30%) também foram observados alguns impróprios para o consumo (Tabela 06). Pode-se observar um número muito elevado de amostras que não se enquadram nos padrões permitidos pela Anvisa, conforme Resolução RDC nº12 de 2 de janeiro de 2001 (BRASIL, 2001).

A má qualidade microbiológica evidenciada por produtos com regulamentação do Serviço de Inspeção Federal, com índice de condenação de 30% para o queijo Minas Frescal produzido com leite pasteurizado, permite questionar o controle feito pelos órgãos de fiscalização, sobretudo no acompanhamento de etapas operacionais.

**Tabela 06.** Distribuição das contagens microbiológicas em Número Mais Provável (NMP/g) de coliformes a 45°C e número de amostras de queijo Minas Frescal, inspecionados (com SIF), produzidos artesanalmente (sem SIF) e temperados colhidos na região do Triângulo Mineiro.

NMP/g de coliformes a 45°C	Amostras com SIF		Amostras sem SIF		Amostras temperadas	
	Frequência Nº	Frequência relativa (%)	Frequência Nº	Frequência relativa (%)	Frequência Nº	Frequência relativa (%)
3,0 a 5x10	17	56,6	7	14	10	32,2
5x10 a 10 <sup>2</sup>	1	3,4	1	2	2	6,4
10 <sup>2</sup> a 5x10 <sup>2</sup>	3	10	7	14	6	19,4
5x10 <sup>2</sup> a 5x10 <sup>3</sup>	9	30	35	70	13	42
Total	30	100	50	100	31	100

Anvisa: Valores mín. 5x10 NMP/g e valor máx. permitido  $\leq 5,0 \times 10^2$  NMP/g para queijo Minas Frescal e valor mín. 5x10 NMP/g e valor max. de 10<sup>2</sup> NMP/g para queijo Minas Frescal temperado.

Os resultados encontrados, independente dos queijos produzidos com inspeção, sem inspeção e os temperados, demonstraram que as condições higiênico-sanitárias

dos produtos testados não são satisfatórias, podendo apresentar riscos à saúde dos consumidores em razão de sua larga comercialização na região do Triângulo Mineiro.

A ingestão de queijos com condições inadequadas para consumo pode levar a graves consequências para a população, sendo, portanto, um problema de Saúde Pública. Segundo a Resolução RDC nº 12, o limite mínimo será o lote aceitável do produto e o limite máximo separa o produto aceitável do inaceitável. Assim valores intermediários entre o limite mínimo e máximo são produtos de qualidade intermediária aceitável, onde a empresa precisa analisar a higiene de processamento dos produtos (BRASIL, 2001).

Os resultados apresentados na Tabela 06 (faixa  $5 \times 10^2$  a  $5 \times 10^3$  NMP/g) demonstraram que somente a aplicação da pasteurização não resolve completamente o problema da qualidade dos queijos. É necessário que haja um investimento na melhoria das instalações, higienização adequada e monitorada dos equipamentos e utensílios e investimento em capacitação de funcionários. Isso mostra que, além do processo de pasteurização ser uma necessidade tecnológica para a obtenção de um queijo com segurança alimentar, outras medidas de higiene devem ser implementadas nos laticínios, visando à melhoria do ambiente, o qual deverá ser objeto de um constante programa de higienização.

A constatação dessa realidade mostra que para a maioria dos queijos tipo Minas, fabricados a partir de leite cru, muitas vezes em pequenas fábricas, em sítios ou fazendas de menor porte, a presença de bactérias as classifica em condições inadequadas de consumo. Diante deste quadro, seria recomendada a atuação mais incisiva dos órgãos de fiscalização sanitária, no intuito de aplicar o que é preconizado na produção deste tipo de queijo, como a pasteurização do leite. É uma prática simples que, se corretamente aplicada, permite a diminuição da carga microbiana inicial com consequente eliminação de patógenos. Além disso, a implementação das boas práticas de fabricação minimizaria o perigo da provável contaminação humana e ambiental (CAMPOS et al., 2006).

De acordo com FARDIN et al. (2008), os alimentos obtidos por processos artesanais têm grande possibilidade de se apresentarem contaminados, devido ao uso

de matérias-primas de fontes não seguras, utensílios mal higienizados ou contaminados, elaboração em condições impróprias e do armazenamento e comercialização em temperatura inadequada, que são fatores que contribuem para aumentar o risco de causar enfermidades. Segundo PEREIRA et al. (1999), apesar das exigências para que o leite destinado ao fabrico de queijos seja higienizado por meios mecânicos adequados e submetidos à pasteurização ou tratamento térmico equivalente, é intensa a comercialização dos queijos Minas fora dessas especificações. Além disso, a contaminação do leite pós-pasteurização, a utilização de fermentos inadequados e incorretas condições de manufatura e armazenagem contribuem também, de forma efetiva, para a má qualidade do produto final.

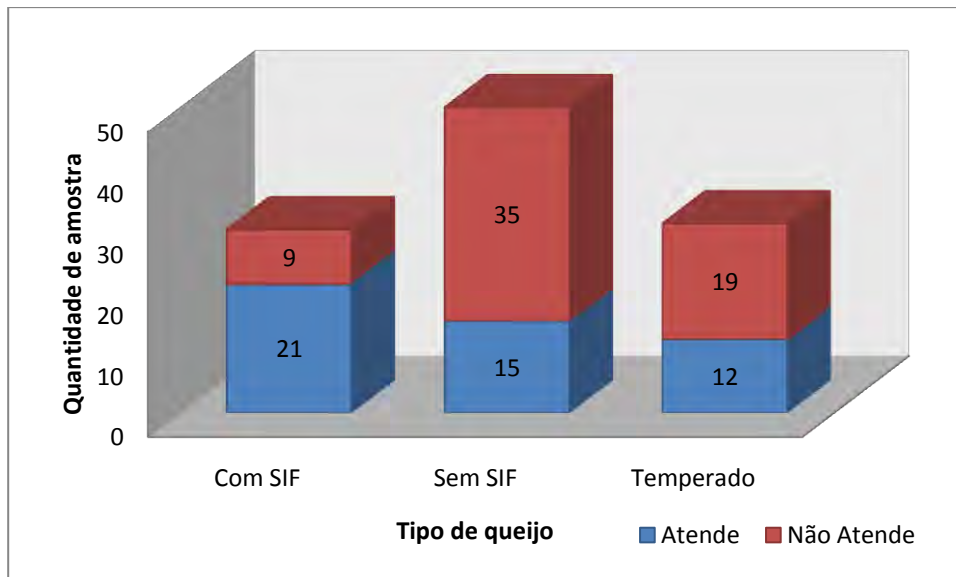
Apesar da proibição legal imposta à comercialização de queijos frescos e moles, elaborados a partir dos leites crus no Brasil, a venda do queijo Minas Frescal produzido artesanalmente tem sido realizada abertamente em nosso meio, especialmente nos Estados de Minas Gerais e São Paulo (SALOTTI et al., 2006; SABIONI & PINHEIRO, 2008). Assim foi possível coletar uma quantidade maior de amostras de queijo Minas Frescal sem Inspeção (sem SIF) na região do Triângulo Mineiro.

Com relação ao padrão permitido quanto a coliformes a 45°C, no caso do queijo sem SIF, o porcentual obtido por SALOTTI et al. (2006), foi semelhante ao encontrado no presente trabalho, pois verificaram que 100% das amostras de queijo Minas Frescal comercializados em Jaboticabal, SP, apresentaram números de coliformes a 45° C acima do limite permitido pela legislação, sendo que 83,3% eram de queijos artesanais sem SIF e 66,7% de queijos com SIF. SOUZA et al. (1993) apresentaram resultados de 90% para queijo Minas Frescal com SIF e 100% para queijo sem SIF de presença de coliformes a 45° C na cidade de Belo Horizonte e BORGES et al. (2003) encontraram coliformes a 35° C e coliformes a 45° C, sendo confirmada a presença de *E. coli* em 93% das amostras.

É amplamente reconhecida a presença de bactérias coliformes a 45° C nos queijos produzidos a partir de leite cru (LOGUERCIO & ALEIXO, 2001; ALMEIDA FILHO & NADER FILHO, 2002), entretanto, para as amostras analisadas neste estudo, provenientes de leite pasteurizado, as expectativas eram de melhores resultados.

Segundo BARROS et al., (2004) e FRAZIER (1992) a pasteurização reduz em 90 a 99% os microrganismos da matéria-prima e conseqüentemente, reduz a presença de coliformes no queijo fresco.

Utilizando o teste Qui-quadrado ( $\chi^2$ ) da Tabela 06 verificou que existe relação significativa entre o tipo de queijo e a análise frente à presença de coliformes a 45° C, para uma significância de 1% (Pvalor = 0,12%). Analisando a proporção de queijos que atendem ou não a RDC nº 12 na contagem de coliformes a 45°C houve uma diferença significativa entre os queijos com SIF e sem SIF (Pvalor = 0,02%) e com o queijo temperado (P valor = 1,17%) , não houve diferença significativa entre os queijos sem SIF e Temperado (Pvalor = 4,17%) (Figura 08).



**Figura 08.** Resultado da quantidade de queijo com SIF, sem SIF e temperado que atendem ou não atendem a RDC nº 12.

Em vista dos fatores expostos, muito embora o serviço de Inspeção dos Produtos de Origem Animal, como um sistema nacional, obrigatório e tradicional ter sido estruturado pelo Serviço de Inspeção Federal do Ministério da Agricultura, contudo ainda não faz parte das rotinas das atividades desenvolvidas monitorar os laticínios e constantemente os produtores de queijo artesanal, impossibilitando o consumidor a

garantia de um leite pasteurizado dentro dos padrões de qualidade para o consumo (OLIVEIRA et al., 2003).

Na Tabela 07, está apresentado o número de amostras positivas pela técnica dos tubos múltiplos das 111 amostras de queijo tipo Minas Frescal analisadas quanto à presença de coliformes a 45° C e *E. coli*. Embora 18 (60%) das 30 amostras de queijo com SIF, 49 (98%) das 50 amostras de queijo sem SIF e 27 (87%) das 31 amostras de queijo sem inspeção temperado apresentassem coliformes a 45° C, presença de *E. coli* ocorreu em 11 (37%) amostras de queijo com SIF, 26 (52%) das amostras de queijo sem SIF e 16 (52%) das amostras de queijo sem SIF temperado. Os resultados são compatíveis com os comentários de SILVA et al. (2006), que descreveu os dados preliminares de um trabalho utilizando o método de tubos múltiplos e mostraram que *E. coli* não foi isolada de uma grande percentagem de alimentos contaminados com coliformes a 45°C, e a identificação bioquímica de *E. coli* foi necessária para a confirmação de contaminação fecal.

**Tabela 07.** Número de amostras positivas pela Técnica de Tubos Múltiplos com amostras de queijo com SIF, queijo sem SIF e queijo temperado comparado com a presença de coliformes a 45°C e *Escherichia coli*.

Amostras	Coliformes a 45° C		<i>Escherichia coli</i>	
	n°/total	%	n°/total	%
Queijo com SIF	18/30	60	11/30	37
Queijo sem SIF	49/50	98	26/50	52
Queijo temperado	27/31	87	16/31	52

MOSSEL et al. (1986) apud PEREIRA et al. (1999) relataram crescimento de *Klebsiella* sp, indologênica e termotolerante na técnica de tubos múltiplos no caldo EC, o que pode mascarar o resultado para *E. coli* e, conseqüentemente acrescentar valores mais elevados de coliformes a 45°C, além da real população presente na amostra.

Os resultados obtidos na Tabela 07 sugerem que a utilização da técnica de tubos múltiplos apresenta ser um bom teste para isolar os microrganismos indicadores que

são geralmente consideradas como sendo de grande significância na avaliação de segurança e qualidade microbiológica dos alimentos (FRANCO & LANDGRAF, 1996).

Atualmente, ao invés de inumerar os coliformes a 45°C e a *E. coli* alguns laboratórios estão preferindo enumerar as bactérias pertencentes à família *Enterobacteriaceae* como um todo, isto é, não só porque podem indicar contaminação fecal, mas também por estarem geralmente implicados em processos infecciosos, demonstrando ainda, um grau considerável de deficiência higiênico-sanitária na elaboração do produto (HOFFMANN et al., 2004).

NASCIMENTO et al. (2009), citaram que a presença de enterobactérias nos alimentos processados é a melhor indicador de contaminação fecal do que o grupo dos coliformes, uma vez que evidenciam um tratamento inadequado ou contaminação pós-processamento podendo ainda, determinar o grau de contaminação fecal.

Verificou-se que, de 30 amostras de queijos produzidos com leite pasteurizado, analisando 10 colônias das placas de EMB inoculados do caldo EC médium positivo, foram isoladas 279 cepas das quais 216 (77,5%) de *E. coli*, 35 (12,5%) de *Proteus*, 12 (4,3%) de *Providencia* e 16 (5,7%) de *Enterobacter*; das 50 amostras de queijo produzidas com leite cru (sem inspeção) do total 670 cepas 578 (86,4%) foram de *E. coli*, 40 (5,9%) de *Proteus*, 36 (3,8%) de *Providencia*, 21 (3,2 %) de *Enterobacter*, 2 (0,29%) de *Serratia* e 3 (0,41%) de *Klebsiella* e das 31 amostras de queijo temperado do total de 970 cepas, 449 (48,8%) foram de *E. coli*, 381 (41,4%) de *Proteus*, 77 (8,4%) de *Providencia* e 13 (1,4%) de *Enterobacter* (Tabela 08). Assim, após o isolamento e identificação bioquímica, foi possível chegar a seis gêneros de *Enterobacteriaceae*, sendo possível em alguns casos a identificação da espécie microbiana. Foram isoladas das amostras positivas para coliformes a 45°C as seguintes bactérias: *E. coli*, *Proteus*, *Providencia*, *Enterobacter*, *Serratia* e *Klebsiella*.

Os microrganismos são relatados por ARAÚJO et al (2001<sup>b</sup>) como capazes de causar infecções e/ou intoxicações alimentares podendo causar febre, calafrios, cefaléia, mialgia, cólica abdominal, diarreia aquosa profusa, vômito, desidratação e choque.



Segundo NASCIMENTO et al., (2009) as *Enterobacteriaceae* além de representarem risco à saúde do consumidor, as contaminações microbianas em alimentos podem causar ainda perda parcial ou total do produto ou redução do tempo de vida de prateleira com repercussões econômicas significativas.

Realizando a análise estatística de qui-quadrado ( $\chi^2$ ) observou que o queijo sem SIF e o queijo temperado apresentaram diferença significativa (p valor = 0,01% e p valor < 0,0001%, respectivamente) com a presença de *E. coli* em relação com o queijo com SIF. Além disso, o queijo temperado apresentou diferença significativa (p valor = 0,0002% e p valor = 0,0008%, respectivamente) com os outros queijos (com SIF e sem SIF) com a presença de *Proteus* e a *Providencia* e o queijo sem SIF apresentou *Enterobacter* significativo (p valor = 0,02%) em relação ao queijo com SIF e o temperado.

**Tabela 08.** Contaminação por *Enterobacteriaceae* em amostras obtidas de queijo Minas Frescal com SIF, sem SIF e temperado, coletadas na região do Triângulo Mineiro.

Microrganismos	Queijo com SIF		Queijo sem SIF		Queijo temperado	
	nº	%	nº	%	nº	%
<i>Escherichia coli</i>	216a	77,5	578b	86,4	449a	48,8
<i>Proteus vulgaris</i>	35a	12,5	40a	5,9	381b	41,4
<i>Providencia</i>	12a	4,3	26a	3,8	77b	8,4
<i>Enterobacter aerogenes</i>	16a	5,7	21b	3,2	13a	1,4
<i>Serratia sp</i>	0	0	2	0,29	0	0
<i>Klebsiella sp</i>	0	0	3	0,41	0	0
<b>TOTAL</b>	<b>279</b>		<b>670</b>		<b>920</b>	

a,b Letras diferentes denotam diferenças significativas.

Os gêneros *Enterobacter*, *Klebsiella* e *Citrobacter*, podem ser microrganismos de origem fecal, mas também são encontradas no ambiente e são detectados nas provas para coliformes a 45°C. Segundo TEBALDI et al. (2008) o grande problema da presença de microrganismos oportunistas como *Citrobacter*, *Enterobacter* e *Klebsiella* no produto é que podem causar doenças em pessoas imunodeprimidas, crianças ou idosos. DIAS & HOFER (1985) relataram que a colonização ambiental dos

microrganismos, principalmente na área nosocomial, se constitui na causa básica da contaminação dos alimentos.

Considerando que o queijo analisado neste trabalho é altamente consumido por crianças como fonte de nutriente, é importante salientar que presença de bactérias *Enterobacteriaceae* torna o produto altamente perigoso para o consumo humano.

Conforme ALMEIDA et al. (2005), uma das formas de controlar o processamento de um alimento é aplicar o princípio da análise de perigos e pontos críticos de controle (APPCC), que consiste em analisar os principais perigos existentes no processamento, apontando soluções que garantam a segurança de todas as etapas, de acordo com os recursos locais. Segundo FRANCO & LANDGRAF (1996) o APPCC, hoje adotado pelos principais mercados mundiais, basicamente assegura que os produtos industrializados sejam elaborados sem risco à saúde pública, apresentem padrões uniformes de identidade e qualidade, atendam às legislações nacionais e internacionais, referentes aos aspectos sanitários de qualidade e integridade econômica. Os sistemas tradicionais de Inspeção de Controle de Qualidade, face às necessidades de melhorarem o desempenho quanto à eficiência, eficácia e relevância social na atividade de assegurar a qualidade dos alimentos, dentro de um sistema de gerenciamento da qualidade do processo industrial, passarão a utilizar como meio auxiliar esse sistema, que pela sua concepção e filosofia, além de assegurar os objetivos propostos, torna mais eficaz o SIF. A boa qualidade do produto final é o maior indicativo da adequação dos métodos utilizados no controle deste processo.

Para um alimento ter uma boa qualidade sanitária, é necessário que seja livre de microrganismos patogênicos. Porém seria impossível examinar cada alimento, como rotina, para verificar a presença de todos os patógenos. Nesse caso, é padronizado o uso da Contagem Padrão em Placa e/ou a enumeração de coliformes, que se refere a *E. coli* e bactérias “semelhantes” a ela em vários aspectos, dentro da família *Enterobacteriaceae* (NASCIMENTO & NASCIMENTO, 2000).

A presença de *E. coli* em um alimento pode ser avaliada sob dois significados. Inicialmente a *E. coli* por ser uma enterobactéria, indica que este tem contaminação microbiana de origem fecal e portanto está em condições higiênicas insatisfatórias. O

outro aspecto a ser considerado é que diversas linhagens de *E. coli* são comprovadamente patogênicas para o homem e animais (LOGUERCIO & ALEIXO, 2001).

Conforme demonstrado na Tabela 09, verificou-se que, pela técnica de aglutinação em lâmina, cinco amostras (1,5%) das 330 cepas de *E. coli* analisadas apresentaram presença característica de EPEC O86, cinco amostras (1,5%) característica de EPEC O126 e apenas dois (0,6%) característica de EPEC O128. O queijo com SIF apresentou cinco amostras da característica EPEC O86, quatro amostra característica da EPEC O126 e uma amostra característica da EPEC O128. O queijo sem SIF apresentou apenas uma amostra caracterísitca para EPEC O126 e uma amostra característica para EPEC O128, no entanto nenhuma amostra suspeita de EPEC foi encontrado nas amostras de queijo temperado. Esses achados são preocupantes pela razão da EPEC ser um importante microrganismo causador de gastroenterites em indivíduos de faixa etária extrema e imunodeprimidos (HOBBS & ROBERTS, 1999; FRANCO & LANDGRAF, 1996).

**Tabela 09.** Análise dos sorogrupos de 333 estirpes de *E. coli* isolados de amostras de queijo tipo Minas Frescal produzidos com leite pasteurizado com SIF, de amostras produzidos com leite cru sem SIF e de amostras de queijo temperado com especiarias comercializados na região do Triângulo Mineiro, MG.

Sorogrupos de <i>E. coli</i>	Nº de sorogrupos encontrados/total de amostras	Freqüência
O86	5/330	1,5%
O126	5/330	1,5%
O128	2/330	0,6%
Total	12/330	3,6%

Muitas pesquisas se preocupavam apenas com presença de coliformes em queijos, entretanto, desde a ocorrência de surto alimentar causada por *E. coli* enteropatogênica cresceu significativamente a preocupação com a quantidade e qualidade de *E. coli* nestas amostras. FRANK & MARTH (1978) citaram que *E. coli* enteropatogênica tem habilidade de crescer durante a produção do queijo macio e

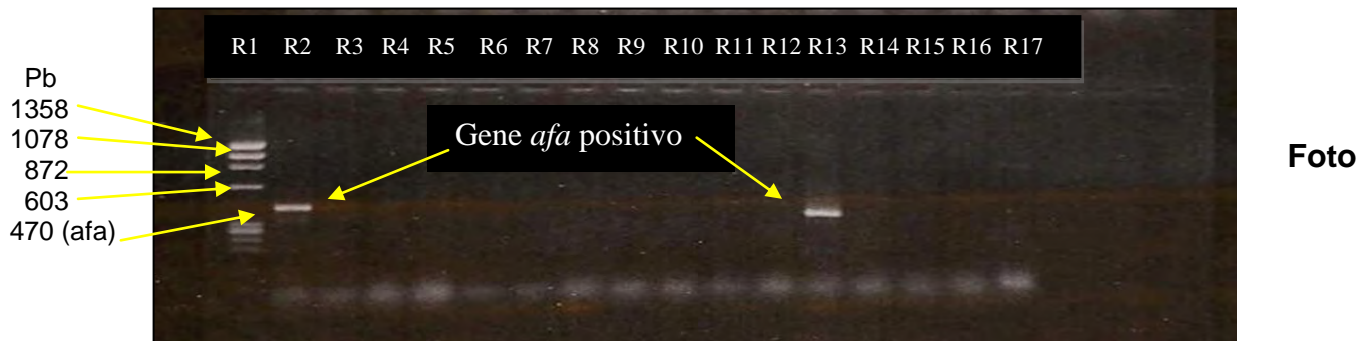
semi-macio. Nossos dados foram incompatíveis com SILVA et al. (2001) que analisaram 208 estirpes de *E. coli* no leite pasteurizado no Rio de Janeiro e obtiveram 22,1% de EPEC. No entanto mais compatíveis com NASCIMENTO et al. (1988) que analisaram 605 estirpes de *E. coli* isoladas de 51 amostras de queijo tipo Minas Frescal na cidade de Ouro Preto e isolaram 9,8% de EPEC que obtiveram os sorogrupos O86, O127, O125 e O26. Já DRUBI & ÁVILA (2007) analisaram 38 amostras de queijo da região de Ribeirão Preto e isolaram 44% de *E. coli* e não obtiveram nenhuma estirpe EPEC.

MARTINS et al. (2003) ressaltaram que estudos relacionados a fatores de virulência, sintomatologia e epidemiologia demonstram que os sorogrupos EPEC são heterogêneos e algumas cepas apresentam expressivo potencial patogênico, podendo corresponder às classes EHEC, EaggEC e DAEC. Portanto a cepa de EPEC em alimentos deve ser considerada como um alerta a nível de Saúde Pública, inclusive no aspecto de doença emergente. Desta forma, a quantidade de estirpes isoladas neste estudo é considerada, no mínimo, preocupante; além do que EPEC se constitui num dos mais importantes agentes etiológicos de infecções intestinais agudas, particularmente na população de menor poder sócio-econômico.

As 330 estirpes de *E. coli* isoladas foram submetidas à técnica de PCR para a verificação da presença dos genes *stx1*, *stx2* e *eae* características das cepas STEC e dos genes *pap*, *afa* e *sfa* características da *E. coli* extra-intestinal (ExPEC). Entre as 330 *E. coli* foi identificada somente uma estirpe a 301 (0,3%) na raia 12 que representa o gene *afa* (Figura 09).

Ambas as espécimes de *E. coli*, patogênica e não patogênica, podem ser hábeis para colonizar o intestino humano, diferindo somente na presença de genes funcionais, que permitem aumentar a aptidão da bactéria, possibilitando sucesso na colonização do hospedeiro ou codificando traços específicos de virulência (GROZDANOV et al., 2004). Segundo SANTO (2006) um fator de virulência que merece atenção é a presença do PAI, mesmo que seja *pap* ou *sfa*, pois apresentaram à cepa uma fraca aderência na célula uroepitelial e a presença de mais que um operon fimbrial aumenta a força de

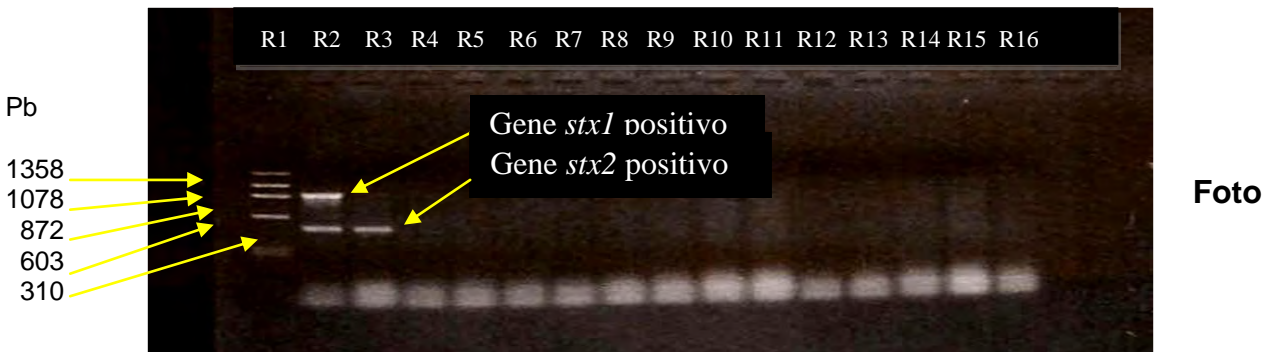
aderência à célula uroepitelial, aumentando a chance de causar infecção no hospedeiro.



**Figura 09.** Eletroforese de produtos de amplificação por PCR em gel TAE 1,5% para os fragmentos específicos do gene *afa* isolado do queijo tipo Minas Frescal. Raia 1 marcador de peso molecular (DNA do vírus  $\phi$ X 174 digerido com Haell Pharmacia Bioscience), Raia 2 cepa 33 controle para o teste *afa*, Raia 13 amostra n° 301 positiva para o gene *afa*.

Conforme ABREU et al. (2010) cepas de patotipo ExPEC foram isoladas em alimentos crus, carnes bovina e carnes de aves, indicando que essas cepas representam uma nova classe de patógenos transmissíveis por alimentos. As ExPEC são definidas como uma linhagem comensal que poderá causar doença quando o alimento permite que as bactérias patogênicas entre em contato com o hospedeiro promovendo a colonização e levando ao estabelecimento da doença (SANTO, 2006). Assim, é importante determinar o grupo de filogenético e de fatores de virulência de *E. coli* isolados de alimentos para identificar a existência de cepas patogênicas que podem causar doenças transmitidas por alimentos.

Neste estudo, não foram detectadas estirpes de *E. coli* produtoras de toxina shiga (STEC) em nenhuma das amostras analisadas (Figura 10) mostrando que as *E. coli* isoladas das amostras de queijo na região do Triângulo Mineiro na maioria são comensais.



**Figura 10.** Eletroforese de produtos de amplificação por PCR em gel TAE 1,5% para a detecção dos genes *stx1* e *stx2* isolados do queijo tipo Minas Frescal. Raia 1 marcador de peso molecular (DNA do vírus  $\phi$ X 174 digerido com Haell Pharmacia Bioscience), Raia 2 cepa controle para o teste *stx1* e *stx2*, Raia amostra controle positiva para o gene *stx2*.

Apesar da ausência de STEC nas amostras de queijo no Triângulo Mineiro existem vários estudos verificando a frequência de contaminações e disseminação de STEC no Brasil, CERQUEIRA et al. (1999) analisaram o gado leiteiro e de corte no Estado do Rio de Janeiro e verificaram uma alta ocorrência dos genes *stx* nestes animais. MOREIRA et al. (2003), analisando fazendas de leite da região de Pelotas, no Rio Grande do Sul, detectaram STEC em 49% dos animais. LIRA et al., 2004 detectaram 12,8% em amostras de leite com mastite. No caso de infecções humanas no Brasil, a *E. coli* com sorogrupo O157 já foi detectado em uma criança em Santa Catarina e outra criança em Rio Grande do Norte (BLANK et al., 2003), ambas menores de 12 meses e hospitalizadas, demonstrando diarreia aguda com vômito e desidratação.

Diferentes variedades de queijo têm sido evidenciadas com combinação de STEC baseadas na presença de cepas STEC isoladas ou na presença do gene *stx*, PANETO et al (2007), ao estudar 50 queijos Minas Frescal elaborados com leite não pasteurizado obtidos na região Centro Oeste do Brasil, encontrou *E. coli* em 96% e, destas, 6% pertenciam ao grupo produtor de toxina shiga. CARDOSO (2009) analisando 59 amostras queijo mussarela produzidos artesanalmente no nordeste de Minas Gerais 16 (10,8%) estirpes apresentaram o gene *stx1* e 13 delas mostraram o

gene *eae* positiva. Os dados sugerem que o queijo pode servir como veículo de transmissão de STEC.

Os resultados da Tabela 10 mostram o comportamento de resistência dos microrganismos frente aos diferentes produtos testados. Verificou-se, nas amostras de queijos produzidos com SIF, a resistência das 90 cepas de *E. coli* foram de 35,5% para cefalotina, 11,1% para ceftriaxona, 20% para estreptomicina, 37,8% para tetraciclina e 7,8% para sulfametoxazol + trimetoprim. Os queijos produzidos sem SIF a resistência de 150 cepas foram de 16% para cefalotina, 0,8% para ceftriaxona, 7,3% para estreptomicina, 4,7% para amicacina, 13,3% para ácido nalidíxico, 32,7% para tetraciclina e 6% para sulfametoxazol + trimetoprim e o queijo temperado com especiarias apresentou resistência de 90 cepas de 8,9% para cefalotina, 2,2% para ceftriaxona, 4,4% para gentamicina, 20% para estreptomicina, 18% para amicacina, 15,6% para ácido nalidíxico, 1,1% para ciprofloxacina, 58,9% para tetraciclina e 26,7% para sulfametoxazol + trimetoprim.

As cepas de *E. coli*, no nosso estudo, se mostraram bastantes sensíveis *in vitro* aos antimicrobianos do grupo das quinolonas (100%) para as *E. coli* testadas nos queijos produzidos com Inspeção SIF e produzidos sem Inspeção SIF, respectivamente, no entanto para os queijos produzidos com especiarias, a maior sensibilidade foi para o ceftriaxona de 92,3%. Resultados semelhantes foram obtidos por FRANCO et al. (1985) que isolaram cepas enteropatogênicas em amostras de alimentos de origem animal e observaram que algumas foram resistentes a um ou mais antibióticos, sendo a maioria sensível aos antimicrobianos estudados. De acordo com KONEMAN et al. (2001) a *E. coli* é suscetível à maioria dos antibióticos, comprovando assim os resultados obtidos no presente estudo.

**Tabela 10.** Distribuição da resistência aos antimicrobianos das estirpes de *Escherichia coli* isoladas de amostras obtidas de queijo Minas Frescal produzidos com SIF, sem SIF e queijo temperado comercializados na região do Triângulo Mineiro.

Classes/ antibióticos	Queijo com SIF (n = 90)				Queijo s/ SIF (n=150)				Queijo Temperado (n=90)			
	I*		R*		I*		R*		I*		R*	
	I*	%	R*	%	I*	%	R*	%	I*	%	R*	%
<b>A) Cefalosporinas</b>												
CFL	23	25,6	32	35,5	56	37,3	24	16	34	37,8	8	8,9
CRO	5	5,6	10	11,1	13	8,7	1	0,7	5	5,6	2	2,2
<b>B) Aminoglicosídeos</b>												
GEN	1	1,1	0	0	5	3,3	0	0	2	2,2	4	4,4
EST	5	5,6	18	20	39	26	11	7,3	36	40	18	20
AMI	3	3,3	0	0	19	12,7	7	4,7	20	22,2	9	10
<b>C) Quinolonas</b>												
NAL	49	54,5	0	0	74	49,3	20	13,3	38	42,2	14	15,6
CIP	0	0	0	0	0	0	0	0	14	15,6	1	1,1
<b>D) Outros</b>												
TET	8	8,9	34	37,8	15	10	49	32,7	9	10	53	58,9
SUT	8	8,9	7	7,8	3	2	9	6	0	0	24	26,7

Onde: Cefalotina (CFL); Ceftriaxona (CRO); Gentamicina (GEN); Estreptomicina (EST); Amicacina (AMI); Ác. Nalidíxico (NAL); Ciprofloxacina (CIP); Tetraciclina (TET); Sulfametoxazol + Trimetoprim (SUT).

\* O perfil de suscetibilidade foi baseado na resistência (R), na sensibilidade intermediária (I) a antimicrobianos.

Os resultados deste trabalho diferem dos obtidos em Goiás por CAMPOS et al. (2006) na qual avaliaram queijo tipo Minas Frescal e obtiveram resistentes a ampicilina de apenas 4%. No entanto, foram compatíveis com PANETO et al. (2007) que avaliaram queijo Minas produzido com leite não pasteurizado da região Centro Oeste obtendo *E. coli* resistentes a cefalotina (60%), ácido nalidíxico (33%), tetraciclina (31%) e ampicilina (29%).

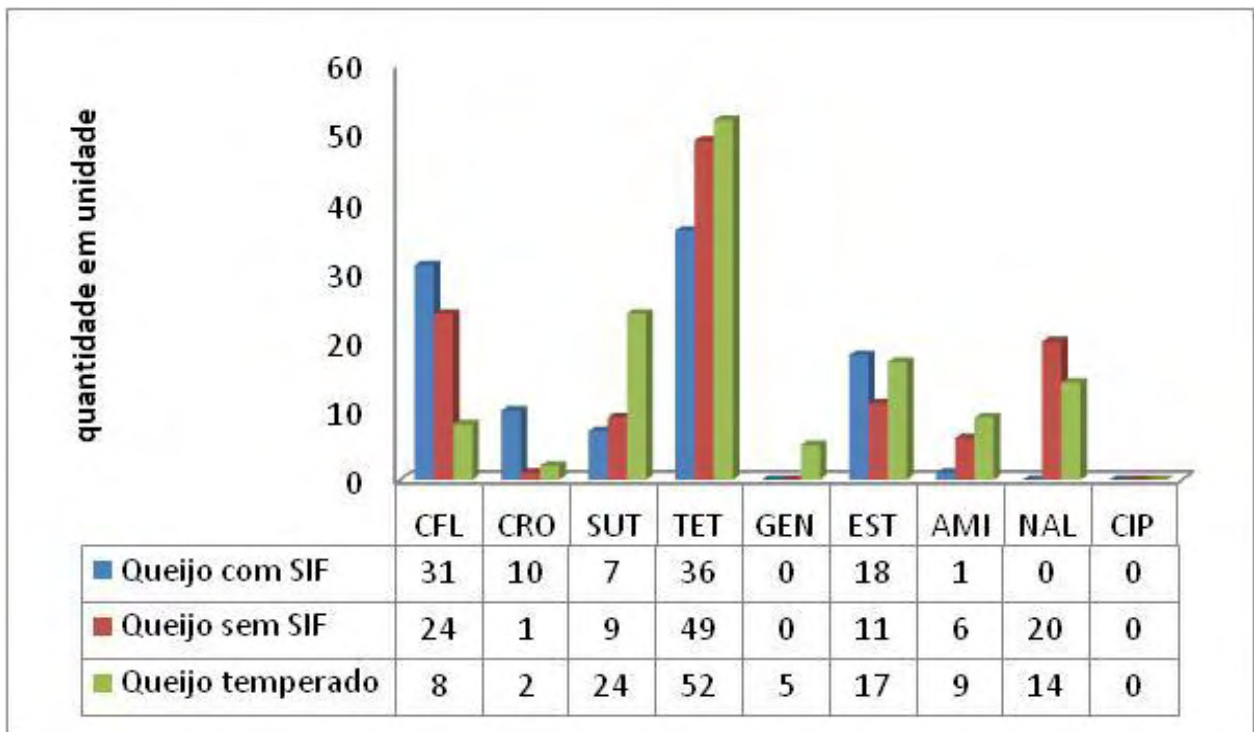
Segundo SILVA (1998), a avaliação do padrão de sensibilidade se faz importante, uma vez que podem ser utilizados em associação com os beta-lactâmicos ou glicopeptídeos, para o tratamento de infecções graves.

Conforme Figura 11, os antibióticos testados no presente estudo tiveram, em geral, uma boa eficiência, com exceção à tetraciclina onde o queijo produzido sem SIF, o queijo produzido com SIF e o queijo temperado apresentaram maior resistência de 37,8%, 32,7% e 58,9%, respectivamente. Segundo TRABULSI et al. (2005), as



bactérias tornam-se resistentes às tetraciclina por aquisição de plasmídios de resistência.

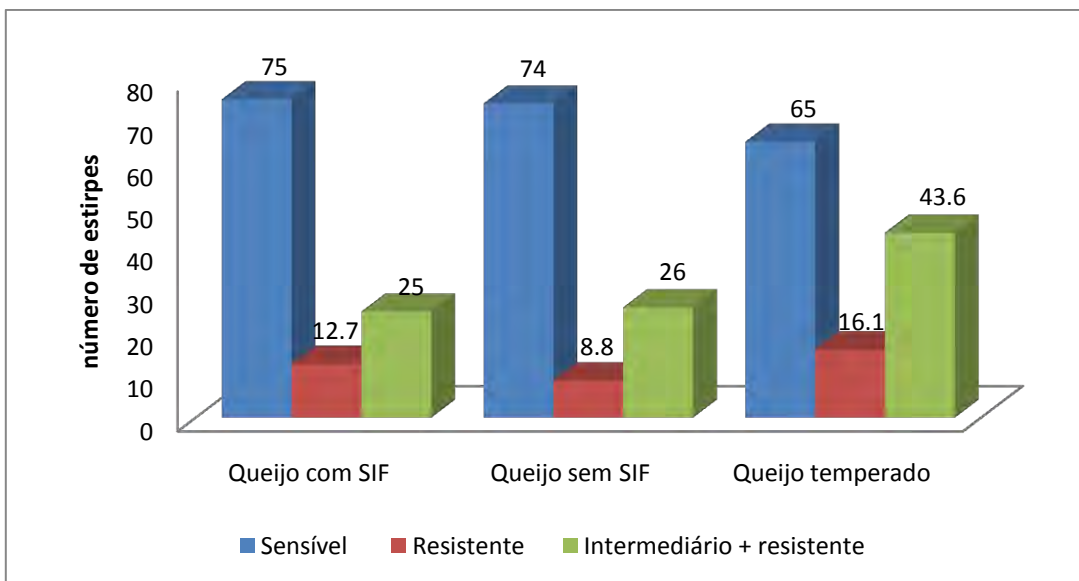
As tetraciclina são inibidores específicos do ribossomo procariótico, elas bloqueiam o receptor na subunidade 30S que se liga ao t-RNA durante a tradução gênica. Há algumas cepas resistentes a tetraciclina que adquirem através de genes em plasmídios de outras bactérias, assim os genes codificam uma proteína que ativamente expulsa a tetraciclina da célula. Outros microrganismos podem codificar uma proteína que se liga ao ribossomo não permitindo a ação do antibiótico, permitindo que também se torne uma cepa resistente (SILVA, 1998).



Onde: Cefalotina (CFL); Ceftriaxona (CRO); Sulfametoxazol + trimetoprim (SUT); Tetraciclina (TET); Gentamicina (GEN); Estreptomicina (EST); Amicacina (AMI); Ác. Nalidíxico (NAL) e Ciprofloxacina (CIP).

**Figura 11.** Resistência antimicrobiana das 330 estirpes de *Escherichia coli* isoladas a partir de queijo tipo Minas Frescal produzido com SIF, sem SIF e temperado comercializados na região do Triângulo Mineiro, MG para cada antibiótico testado.

Neste estudo, 75% (606/810) do queijo Minas Frescal com SIF, 74% (997/1350) do queijo sem SIF e 65% (522/810) ao queijo temperado apresentaram-se sensíveis a todos os nove antimicrobianos testados considerando apenas 12,7% (103/810); 8,8% (120/1350) e 16,1% (131/810) respectivamente, resistentes para os mesmos antibióticos (Figura 06) foram observado que as *E. coli* isoladas do queijo temperado apresentaram maior resistência aos antibióticos testados, seguidos pelas *E. coli* do queijo pasteurizado. MONTELLI & SADATSUNE (2001) citaram que 95% de todas as cepas isoladas de material patológico são sensíveis ou resistentes. Por outro lado, nos Estados Unidos, apenas 21% dos laboratórios medem as zonas com precisão e a maioria dos clínicos, por medida de segurança, considera os resultados intermediários como resistentes. Assim se alterando o resultado do intermediário para resistentes, verifica-se na Figura 12 que houve uma pequena alteração na resistência aos antimicrobianos de 12,7% para 25% (204/810) para o queijo com SIF, 8,8% para 26% (353/1350) para o queijo sem SIF e 16,1% para 43,6% (148/810), ou seja, um aumento de 12,3%, 18,3% e 27,5% respectivamente, sobre os antibióticos testados.



**Figura 12.** Distribuição dos padrões da sensibilidade, resistência e intermediário + resistência dos antibióticos testados, detectados em 330 estirpes de *E. coli* isoladas de queijo tipo Minas Frescal na região do Triângulo Mineiro.

Conforme Figura 12, verificou-se neste estudo, que houve diferença na quantidade de antimicrobianos resistentes com os resistentes acrescidos de intermediário nas estirpes de *E. coli* testadas dos diferentes queijos.

Segundo BARBOSA et al. (2007), alimentos de origem animal são considerados importantes vetores para a transferência de resistência aos antibióticos. Tal transferência é possível por meio da presença de resíduos de antibióticos no alimento e transferência de patógenos do alimento para o consumidor. No entanto, segundo MENG et al. (2001) elevadas temperaturas (de 45°C) e o lauril sulfato de sódio usados no caldo para a estimativa de Número Mais Provável (NMP) das técnicas atuais de quantificação dos coliformes podem causar a perda dos plasmídios que são fatores associados à veiculação da resistência da *E. coli*, podendo diminuir ou alterar os valores dos resistentes na amostra analisada.

Existem registros na literatura que *E. coli* isolada de amostras alimentícias é habitualmente sensível à maioria dos antimicrobianos testados. Entretanto, dados mais recentes revelam o aparecimento de cepas resistentes a diversos antimicrobianos, tais como gentamicina, estreptomicina, ampicilina, tetraciclina, amicacina e sulfonamidas, inclusive com a ocorrência de cepas multi-resistentes a dois ou mais desses antimicrobianos de importância terapêutica (RIBEIRO et al., 2009; RANGEL & MARIN, 2009; STELLA et al., 2008; MOTA et al., 2005)

Coliformes antibiótico-resistentes podem ser importantes não só por sua potencialidade patogênica como por transferirem resistência para outras bactérias patogênicas, podendo se converter em um problema de Saúde Pública (LÁZARO, et al., 1999).

A porcentagem de resistência das cepas de *E. coli* à tetraciclina, cefalotina e sulfametoxazol + trimetoprim tem importância por se tratarem de cepas de ambiente não hospitalar, onde se sabe que o uso não criterioso dos agentes antimicrobianos, tem contribuído significativamente para as mudanças nos padrões de resistência antibiótica dificultando o sucesso da terapia anti-infecciosa (TOWNSEND & SCHELD, 1996). Da mesma forma, na pecuária leiteira o uso indevido de antibióticos leva à seleção de cepas que poderão causar infecções humanas de difícil resolução (GUSTAFSON,

1992). Já a tetraciclina, beta-lactâmicos e macrolídeos são os antibióticos mais comumente administrados em medicina veterinária e agricultura para a terapêutica e profilaxia (HARVEY, 2008).

RIBEIRO et al. (2006) citaram que o crescimento da resistência múltipla de estirpes de *E. coli* isoladas de leite de bovinos tem alertado para o risco de veiculação de linhagens multi-resistentes ao homem, mediante o consumo de leite e/ou derivados. De acordo com FILIPPSEN et al. (2005), *E. coli* mutantes com resistência múltipla à antimicrobiana expressam elevados níveis de resistência a um largo espectro de antibióticos estruturalmente não relacionados.

A partir deste resultado na Tabela 11, pode-se verificar que os perfis de resistência múltipla antimicrobiana que apresentaram maior frequência, neste trabalho, para amostra de queijo com SIF foram cefalotina-ceftriaxona com sete estirpes (18,9%), seguido por cotrimoxazol-tetraciclina (16,2%). Para o queijo sem SIF, a maior frequência foi tetraciclina-ácido nalidíxico com sete estirpes (25%) seguidas por cefalotina-tetraciclina com cinco estirpes (17,9%) e para o queijo temperado sem SIF a maior frequência foi cotrimoxazol-tetraciclina-estreptomicina com 10 estirpes (19,6%), seguido por cotrimoxazol-tetraciclina com 6 estirpes (11,8%).

Neste estudo, 41,1% das linhagens de *E. coli* isoladas do queijo com SIF mostraram resistência a dois ou mais antimicrobianos para 18,7% de *E. coli* do queijo sem SIF e 56,7% para os isolados do queijo temperado com especiarias. O resultado do queijo produzido com leites crus (sem SIF) foi compatível com os dados encontrados por RIBEIRO et al., (2006) que verificou 20% de *E. coli* multi-resistentes no leite cru.

Algumas das *E. coli* multi-resistentes isoladas foram resistentes à tetraciclina, no entanto, segundo KATZUNG (2003), as tetraciclina são inibidores específicos do ribossoma procariótico e como o ribossoma eucariótico das células humanas é substancialmente diferente, o consumidor não é afetado diretamente.

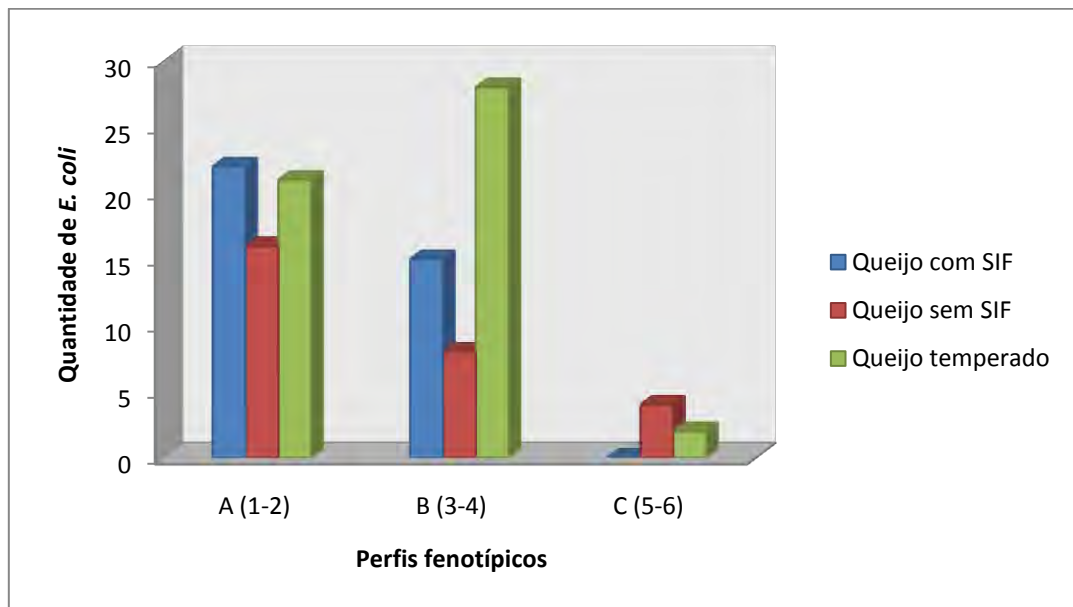
**Tabela 11.** Resistência múltipla apresentada pelas amostras de *E. coli* isolados dos queijos tipo Minas Frescal.

Amostra	Número de isolados testados	Resistência de 2 ou mais antibióticos	Multi-ressistentes
Queijo com SIF	90	CFL, CRO	7
		SUT, TET	6
		CFL TET	3
		TET, EST	5
		CFL,EST	1
		CFL, CRO, SUT	1
		CFL, CRO, TET	2
		CFL, TET,EST	12
<b>TOTAL</b>			<b>37</b>
Queijo sem SIF	150	CFL, AMI	1
		CFL, TET	5
		CFL, EST	1
		CRO, TET	1
		TET, EST	1
		TET,NAL	7
		CFL, TET, NAL	2
		CFL, TET, AMI	1
		CFL, SUT, TET	1
		SUT, TET, EST	1
		SUT, TET, NAL	1
		CFL, SUT, TET, NAL	1
		SUT, TET, EST, NAL	1
		CFL, SUT, TET, EST, NAL	3
		CFL, SU, TET, GEN, NAL	1
<b>TOTAL</b>			<b>28</b>
Queijo Temperado	90	CFL, CRO	1
		TET, NAL	5
		TET, AMI	4
		TET, EST	4
		TET, GEN	1
		SUT, TET	6
		CFL, SUT, TET	1
		TET, EST, AMI	2
		TET, GEN, EST	2
		TET, GEN, NAL	1
		SUT, TET, EST	10
		SUT, TET, NAL	5
		CFL, CRO, SUT, TET	1
		CFL, SUT, TET, NAL	2
		SUT, TET, EST, AMI	1
		SUT, TET, AMI, NAL	2
SUT, TET, EST, NAL	1		
CFL, TET, AMI, NAL, CIP	1		
TET, GEN, EST, AMI, NAL	1		
<b>TOTAL</b>			<b>51</b>

Onde: Amoxicilina (AMO); Cefalotina (CFL); Ampicilina (AMP); Ceftriaxona (CRO); Sulfametoxazol + trimetoprim (SUT); Tetraciclina (TET); Gentamicina (GEN); Estreptomina (EST); Amicacina (AMI); Ác. Clavulônico + Amoxicilina (AMC); Ác. Nalidíxico (NAL) e Ciprofloxacina (CIP).

Conforme Figura 13, a partir do teste de susceptibilidade para as 330 cepas isoladas, foi possível agrupá-las em três diferentes perfis fenotípicos: A (de 1 a 2 antibiótico), B (3 a 4) e C (5 a 6) das estirpes isoladas. No perfil A, 22 cepas de *E. coli* do queijo com SIF se apresentaram multi-resistentes seguido de 15 estirpes no perfil B. O queijo sem SIF apresentou 16 estirpes no perfil A, oito estirpes no perfil B e apenas quatro estirpes no perfil C, já o queijo temperado apresentou 21 estirpes no perfil A, 28 estirpes no perfil B e apenas 2 estirpes no perfil C.

Observou, neste trabalho, que as estirpes de *E. coli* isoladas do queijo sem SIF e temperado com especiarias apresentaram multi-resistentes nos três perfis fenotípicos.



**Figura 13.** Distribuição de multi-resistência a nove antimicrobianos em 330 estirpes de *Escherichia coli* isolados de amostras de queijos tipo Minas Frescal com SIF, sem SIF e queijo temperado, comercializados na região do Triângulo Mineiro.

Segundo ROSSI & ANDREAZZI (2005) como a atividade da droga, *in vitro*, não considera fatores importantes como idade, local de infecção, presença de abscesso, penetração da droga, ligações protéicas, concentração da droga e outros, um resultado resistente no antibiograma diminui muito as chances de sucesso clínico. Portanto, há necessidade de monitorar mudanças e tendências de padrões de resistências para

sinalizar a necessidade de novas drogas para atendimento das necessidades terapêuticas.

Considerando que os queijos temperados apresentaram menor presença de *E. coli* (Tabela 08, p.54) e maior quantidade de estirpes resistentes e multi-resistentes (Tabela 11, p.65) aos antibióticos utilizados, conduziu-se o trabalho, na produção de queijo temperado produzidos com leites crus no laboratório, padronizando a esterilização dos temperos e suas quantidades utilizadas no produto, para verificar o efeito dos temperos sobre os coliformes a 35°C e coliformes a 45°C.

As concentrações das especiarias nos alimentos são determinadas pela preferência de sabores e, normalmente, encontram-se entre 0,5 a 1,0% no produto final (ERNANDEZ & GARCIA-CRUZ, 2007). Assim, acrescentou-se 1% de especiaria (p/p) nos queijos temperados neste trabalho, porém, conforme o resultado na Tabela 12, a quantidade de condimento não inibiu o crescimento bacteriano dos coliformes a 35°C. O resultado vem de acordo com SEYDIM & SARIKUS (2006) que testou película de óleo essencial de orégano a 1% a qual não foi efetivo contra nenhum microrganismo.

Segundo PORTE & GODOY (2001), as bactérias Gram-negativas são menos afetadas pelo extrato ou óleo essencial das plantas possivelmente porque a parede celular apresenta lipopolissacarídeos que evitam que os componentes atinjam a membrana citoplasmática e exerçam a ação destruidora da célula. Assim, de maneira geral, as bactérias Gram-positivas são mais sensíveis aos condimentos do que as bactérias Gram-negativas.

Conforme a Tabela 12, verificou-se que a contagem em Unidade Formadora de Colônia (UFC) dos coliformes a 35°C foi elevada, aproximadamente  $10^5$  UFC/g para todos os queijos. O orégano na concentração de 1% apresentou uma eficiência de 10,8% na diminuição dos coliformes a 35°C, no entanto, a salsinha e a mistura de orégano com salsinha não foram eficazes para alterar ou diminuir a quantidade de coliformes a 35°C presentes nos queijos, isto é, não apresentou efeito sobre os microrganismos. Segundo QUEIROGA et al., (2009), as especiarias apresentam pequenas concentrações de diversas substâncias químicas, assim, a ineficiência sobre os coliformes a 35°C isolados dos queijos analisados, sugere-se que a molécula ativa

destas especiarias encontram-se em baixas concentrações para inativar os microrganismos.

**Tabela 12.** Resultados da contagem em Unidade Formadora de Colônia (UFC) de coliformes a 35°C nos queijos produzidos com leite cru e temperados com 1% de orégano, 1% de salsinha e 0,5% de orégano acrescido de 0,5% de salsinha.

Amostras	Queijo sem tempero (controle) ( $\times 10^5$ )	Queijo com 1% de orégano ( $\times 10^5$ )	Queijo com 1% de salsinha ( $\times 10^5$ )	Queijo com 0,5% de orégano e 0,5% de salsinha ( $\times 10^5$ )
1	1,45	1,15	1,80	1,87
2	1,22	1,10	0,15	1,80
3	1,58	1,30	1,20	1,30
4	1,53	1,28	1,30	1,37
5	0,82	1,15	1,25	1,30
6	1,47	1,10	1,10	1,25
7	1,50	1,05	1,20	0,86
8	1,40	1,70	1,60	2,00
9	1,30	1,30	1,45	1,30
10	1,70	1,33	0,95	1,02
Média	1,39	1,24	1,40	1,40
Eficiência		10,8%	-7,2%	-7,2%

No presente trabalho calculou-se o coeficiente de variação (CV) para verificar o grau de dispersão do efeito das especiarias em torno da média, conforme descrito na Tabela 13. O grupo com 0,5% de orégano + 0,5% de salsinha apresentou uma dispersão relativa maior de 26%, seguido do grupo com 1% de salsinha com 19%, grupo controle com 17,5% e o que apresentou menor valor foi o grupo com 1% de orégano contendo somente orégano com CV de 15,1% (Tabela 13).

Com base nos valores máximos e mínimos (Tabela 13), visualizou-se uma pequena amplitude nos dados entre os grupos testados, o que demonstra uma pequena influência das especiarias nos coliformes a 35°C.

A Tabela 13 vem confirmar o resultado da Tabela 3 (p.48) onde os queijos apresentaram uma elevada contaminação por coliformes a 35°C, não havendo diferença significativa de resultados entre as amostras que possuíam SIF entre aquelas



que não o possuíam, mas eram temperados, caracterizando uma deficiência nas ações dos condimentos utilizados com a intenção de inibir estes microrganismos.

Os resultados foram compatíveis com QUEIROGA et al. (2009) que avaliando o queijo “tipo Minas Frescal” acrescido de orégano a 1% encontraram valores de 8,48 log (UFC/g) para os microrganismos aeróbios mesófilos, evidenciando que o orégano nesta concentração não provoca efeito bactericida sobre os microrganismos.

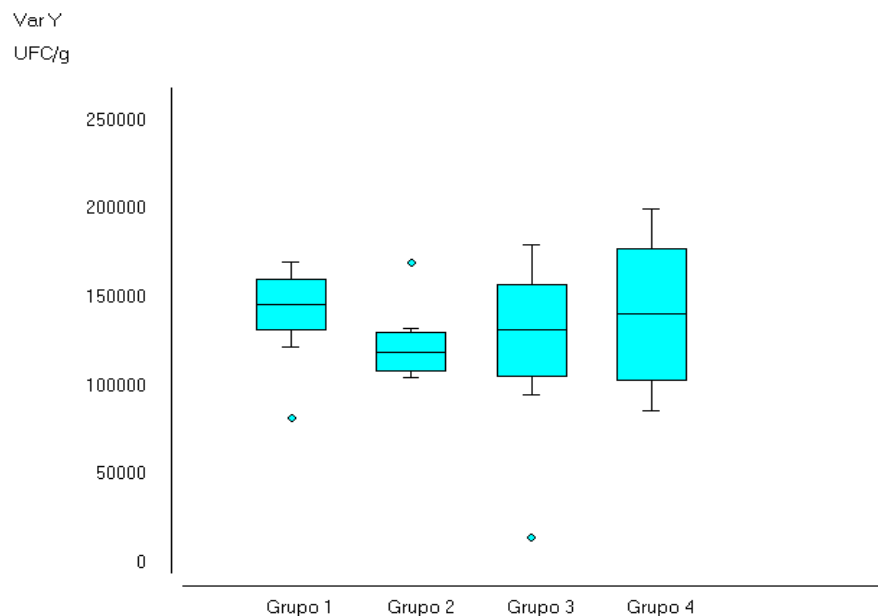
**Tabela 13.** Resultado da análise estatística dos resultados da contagem em Unidade Formadora de Colônia (UFC) dos coliformes a 35°C nos queijos tipo Minas Frescal inoculados com especiarias.

	Queijo sem tempero (controle)	Queijo com 1% de orégano	Queijo com 1% de salsinha	Queijo com 0,5% de orégano e 0,5% de salsinha
Tamanho da amostra	10	10	10	10
Mínimo	$8,2 \times 10^4$	$1,0 \times 10^5$	$9,5 \times 10^4$	$8,6 \times 10^4$
Máximo	$1,7 \times 10^5$	$1,7 \times 10^5$	$1,8 \times 10^5$	$2,0 \times 10^5$
Amplitude Total	$8,8 \times 10^4$	$6,5 \times 10^4$	$8,5 \times 10^4$	$1,1 \times 10^5$
Mediana	$1,4 \times 10^5$	$1,2 \times 10^5$	$1,2 \times 10^5$	$1,3 \times 10^5$
Primeiro Quartil (25%)	$1,3 \times 10^9$	$1,1 \times 10^9$	$1,2 \times 10^9$	$1,2 \times 10^9$
Terceiro Quartil (75%)	$1,5 \times 10^9$	$1,3 \times 10^9$	$1,4 \times 10^9$	$1,6 \times 10^9$
Desvio Interquartilico	$1,9 \times 10^8$	$1,8 \times 10^8$	$2,8 \times 10^8$	$4,3 \times 10^8$
Média Aritmética	$1,3 \times 10^5$	$1,2 \times 10^5$	$1,3 \times 10^5$	$1,4 \times 10^5$
Desvio Padrão	$2,4 \times 10^4$	$1,8 \times 10^4$	$2,5 \times 10^4$	$3,6 \times 10^4$
Erro Padrão	$7,7 \times 10^3$	$5,9 \times 10^3$	$7,9 \times 10^3$	$1,1 \times 10^4$
Coefficiente de Variação	17.46%	15.12%	18.94%	25.98%
Assimetria (G1)	-1,5	1,6	0,4	0,3
Curtose (G2)	3,2	3,5	-0,2	-0,7

Os resultados dos testes apresentados no Gráfico através do Diagrama em caixa (Box-plot) da Figura 08 demonstram que em um nível de significância de 5% ( $p > 0,05$ ), para a maioria dos parâmetros, as amostras dos quatro grupos analisados não apresentaram diferença significativa entre os coliformes a 35°C. No entanto, observou valores discrepantes para os queijos do grupo controle e no queijo com 1% de orégano. Conforme Figura 08, observou-se pouca diferença entre os grupos amostrados.

Aparentemente o grupo 2, 3 e 4 apresentam níveis de contaminação levemente menor que o grupo 1, principalmente o grupo 2 (orégano).

A estatística descritiva mostra amplitude maior de dados para o Grupo 4. As medianas e médias aritméticas tiveram valores próximos para cada grupo individualmente o que denota normalidade, confirmando pela assimetria e coeficiente de curtose observado na Figura 14.



Onde: Grupo 1- Controle, Grupo 2 – Queijo com 1% de orégano, Grupo 3 – Queijo com 1 % de salsa e Grupo 4 – Queijo com 0,5% de orégano + 0,5% de salsa.

**Figura 14.** Resultados da Unidade Formadora de Colônia dos coliformes a 35°C, isolados nos grupos de queijos com relação aos quartis, desvio padrão e valor discrepante (*outliers*).

Verificou-se, pelo teste de *Lilliefors* (Apêndice 4a), que os coeficientes de variação de todos os grupos apresentam distribuição aproximadamente normal, em nível de 1% de probabilidade. Assim, os dados permitiram a adoção de teste paramétrico de comparação múltipla ANOVA (Tabela 14).

Conforme Tabela 14, ao nível de significância de 5% como 3 graus de liberdade, o valor de F na tabela é de 3,18, observou-se que não há diferenças significativas a 5% entre os grupos, o que permite a aceitação de H0, ou seja, amostras são iguais ao controle.

**Tabela 14.** Resultado do teste ANOVA para o grupo de queijo temperado analisados para coliformes a 35° C.

<b>Fontes de variação</b>	<b>GL</b>	<b>F</b>	<b>F (tabela)</b>
Tratamentos	3	0,7974	3,18
Erro	36		
(p)	0.5061		

Onde: GL =Grau de Liberdade.

A Tabela 15 representa os resultados da Contagem de Unidade Formadora de Colônica (UFC) de coliformes a 45°C nos queijos produzidos com leite cru acrescidos de especiarias. Observando o resultado da Tabela 15, o acréscimo de 1% de orégano teve uma eficiência de 89,6% sobre os coliformes a 45°C, 1% de salsinha apresentou uma eficiência de 85,3% e a junção de 0,5% de orégano mais 0,5% de salsinha apresentou uma eficiência de 88,6%. Observou que o orégano apresentou maior eficiência sobre os coliformes a 45° C, seguido da mistura de orégano com salsinha e em seguida somente com a salsinha.

**Tabela 15.** Resultados da Contagem de Unidade Formadora de Colônia (UFC) de coliformes a 45° C dos queijos produzidos com leite cru e temperados com 1% de orégano, 1% de salsinha e 0,5% de orégano acrescido de 0,5% de salsinha.

Amostras	G1 (UFC/g)	G2 (UFC/g)	G3 (UFC/g)	G4 (UFC/g)
1	2,0x10 <sup>2</sup>	9,0x10	9,0x10	9,0x10
2	1,0x10 <sup>2</sup>	1,0x10	6,0x10	2,0x10
3	1,0x10 <sup>2</sup>	5,0x10	8,0x10	2,0x10
4	1,0x10 <sup>3</sup>	4,0x10	3,0x10	4,0x10
5	3,6x10 <sup>2</sup>	1,0x10	1,0x10	6,0x10
6	5,0x10 <sup>2</sup>	1,0x10	4,0x10	1,0x10
7	4,0x10 <sup>2</sup>	1,0x10	2,0x10	3,0x10
8	4,0x10	3,0x10	0	3,0x10
9	4,0x10	2,0x10	6,0x10	1,0x10
10	6,0x10	2,0x10	2,0x10	1,0x10
Média	2,8x10 <sup>2</sup>	2,9x10	4,1x10	3,2x10
Eficiência		89,6%	85,3%	88,6%

Onde: G1= Queijo sem tempero (controle); G2 = Queijo com 1% de orégano; G3 = Queijo com 1% de salsinha e G4 = Queijo com 0,5% de orégano + 0,5% de salsinha.

As especiarias apresentaram um efeito sobre os coliformes a 45°C. A Tabela 15 vem em desacordo com o resultado da Tabela 4 (p.50) onde os queijos apresentaram uma elevada contaminação por coliformes a 45° C no queijo temperado. Segundo FURLANETO & MENDES (2004), quando se adicionam especiarias não bem higienizadas, acabam contaminando os alimentos, elevando a carga microbiana, confirmando o resultado da Tabela 15, onde os queijos temperados produzidos no laboratório utilizaram somente especiarias higienizadas e sanitizadas, evitando a recontaminação do produto. Conforme SOUZA et al. (2005<sup>a</sup>) citaram que as especiarias e seus produtos derivados tem mostrado resultados satisfatórios na inibição de microrganismos patogênicos oportunistas e patógenos primários.

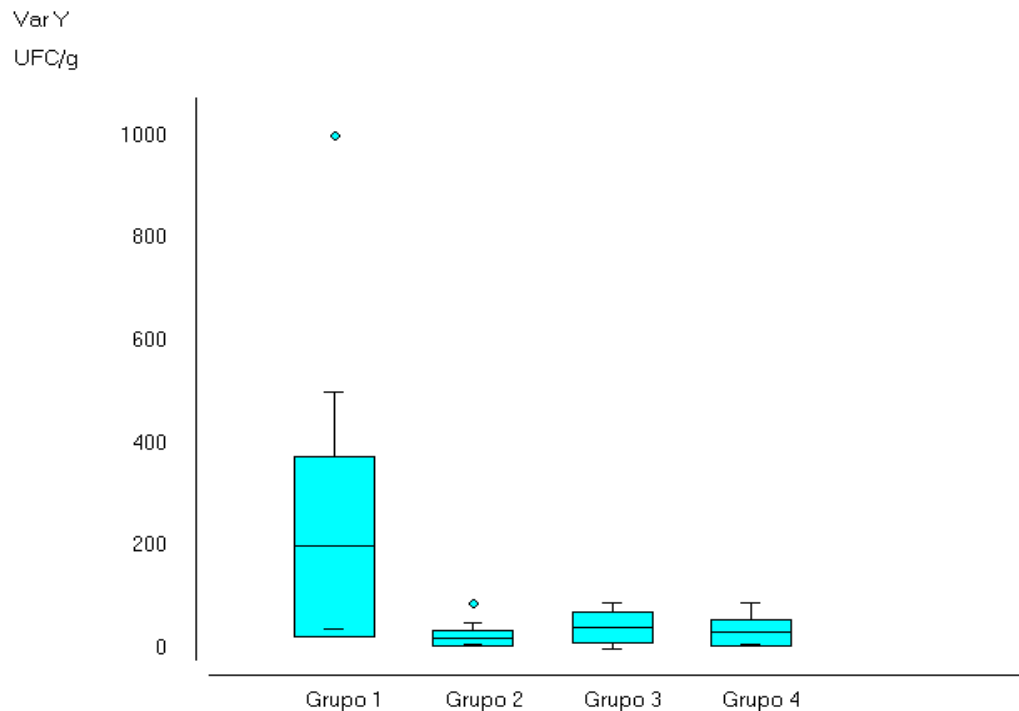
Analisado a estatística descritiva, observou maior variabilidade para os queijos do grupo 1 (controle). O grupo 1 apresentou erro padrão muito maior em relação aos demais grupos comparados, além de apresentar valores muito diferentes para média aritmética e mediana conforme apresentado na Tabela 16.

**Tabela 16.** Resultado da análise estatística descritiva, mostrando a distribuição dos dados e variabilidade nos grupos de queijos analisados para coliformes a 45°C.

	<b>G1</b>	<b>G2</b>	<b>G3</b>	<b>G4</b>
Tamanho da amostra	10	10	10	10
Amplitude Total	$9,6 \times 10^2$	$8 \times 10$	$9 \times 10$	$8 \times 10$
Mediana	$1,5 \times 10^2$	$2 \times 10$	$3,5 \times 10$	$2,5 \times 10$
Primeiro Quartil (25%)	$7 \times 10^5$	$1 \times 10^5$	$2 \times 10^5$	$1,2 \times 10^5$
Terceiro Quartil (75%)	$3,9 \times 10^5$	$3,7 \times 10^5$	$6 \times 10^5$	$3,7 \times 10^5$
Desvio Interquartilico	$3,2 \times 10^6$	$2,7 \times 10^5$	$4 \times 10^5$	$2,5 \times 10^5$
Média Aritmética	$2,8 \times 10^2$	$2,9 \times 10$	$4,1 \times 10$	$3,2 \times 10$
Variância	$9,1 \times 10^4$	$6,5 \times 10^2$	$9,2 \times 10^2$	$6,6 \times 10^2$
Desvio Padrão	$3 \times 10^2$	$2,5 \times 10$	$3 \times 10$	$2,5 \times 10$
Erro Padrão	95,6	8,1	9,6	8,1
Coefficiente de Variação	107,96%	88,21%	74,02%	80,42%
Assimetria (G1)	1,7	1,7	0,4	1,5
Curtose (G2)	3,0	3,1	-1,1	2,0

Onde: G1= Queijo sem tempero (controle); G2 = Queijo com 1% de orégano; G3 = Queijo com 1% de salsinha e G4 = Queijo com 0,5% de orégano + 0,5% de salsinha.

Os resultados dos testes apresentados no Gráfico através do Diagrama em caixa (Box-plot) da Figura 15 demonstram que em um nível de significância de 5% ( $p > 0,05$ ), para a maioria dos parâmetros, as amostras dos quatro grupos analisados apresentaram diferença significativa entre os coliformes a 45°C. Observaram-se valores discrepantes para os queijos do grupo 1 e do grupo 2. No entanto, os dados apresentaram menor variabilidade para os grupos do queijo com 1% de orégano, do queijo com 1% de salsinha e do queijo com 0,5% de orégano e com 0,5% de salsinha. Os grupos 2, 3 e 4 apresentaram níveis de contaminação menor que o grupo 1, principalmente o grupo 2 (orégano).



Onde: G1= Queijo sem tempero (controle); G2 = Queijo com 1% de orégano; G3 = Queijo com 1% de salsinha e G4 = Queijo com 0,5% de orégano + 0,5% de salsinha.

**Figura 15.** Resultado das médias, quartis, pontos discrepantes e variabilidade dos dados do coliformes a 45° C.

Verificou-se, pelo teste de *Lilliefors* (Apêndice 5a), que os coeficientes de variação de todos os grupos apresentam distribuição aproximadamente normal, em nível de 5% de probabilidade. Assim, os dados permitiram a adoção de teste paramétrico de comparação múltipla ANOVA (Tabela 17). Adotou-se a análise por comparações múltiplas nos testes de Kruskal Wallis (KW) e a análise pelo método de Tukey nos testes de ANOVA, cujos resultados estão apresentados, respectivamente, na Tabela 17, onde pode verificar quais amostras são significativas. Assim, observou-se que houve diferença significativa entre a amostra controle (queijo sem tempero) com os

demais queijos temperados, no entanto não houve diferença significativa entre os temperos testados, aceitando-se a hipótese alternativa.

**Tabela 17.** Resultados do teste ANOVA, complementar Tukey para comparação das médias nas amostras nos respectivos grupos analisados.

<b>Fontes de variação</b>		<b>GL</b>	<b>SQ</b>	<b>QM</b>
Tratamentos		3	$4,5 \times 10^5$	$1,5 \times 10^5$
Erro		36	$8,4 \times 10^5$	$2,3 \times 10^4$
F		6,4754		
(p)		0.0016		
Média (Grupo 1)		$2,8 \times 10^6$		
Média (Grupo 2)		$2,9 \times 10^5$		
Média (Grupo 3)		$4,1 \times 10^5$		
Média (Grupo 4)		$3,2 \times 10^5$		
<b>Tukey</b>	<b>Diferença</b>	<b>Q</b>	<b>(p)</b>	
Média (G1 a G2)	$2,5 \times 10^6$	5,1884	<0,01	
Média (G1 a G3)	$2,3 \times 10^6$	4,9403	<0,01	
Média (G1 a G4)	$2,4 \times 10^6$	5,1263	<0,01	
Média (G2 a G3)	$1,2 \times 10^5$	0,2480	Ns	
Média (G2 a G4)	$3 \times 10^4$	0,0620	Ns	
Média (G3 a G4)	$9 \times 10^4$	0,1860	Ns	

Onde: G1= Queijo sem tempero (controle); G2 = Queijo com 1% de orégano; G3 = Queijo com 1% de salsinha e G4 = Queijo com 0,5% de orégano + 0,5% de salsinha; ns = não significativo a 1%.  
GL =Grau de liberdade; SQ = soma dos quadrados; QM =

Os intervalos de confiança de 95% para testes bicaudais, para os quatro grupos foram expressos no Apêndice 5b.

Analisando os resultados acima, houve interesse em observar o comportamento das especiarias em queijo temperado produzidos com leite cru, no entanto acrescidos de *E. coli* com ATCC conhecida (ATCC 25922).

No experimento, produziu-se a mesma quantidade de queijos com as mesmas concentrações de especiarias, no entanto no leite cru acrescentou-se 10 ml (concentração de  $10^8$ ) de *E. coli* ATCC 25922 antes da produção destes queijos.

Observou na Tabela 18 que houve uma diminuição dos coliformes a 35°C com o acréscimo de especiarias nos queijos de 69%, 69% e 52,4%, em 1% de orégano, 1% de salsinha e 0,5% de orégano acrescido de 0,5% de salsinha, respectivamente. Os

dados evidenciaram que os coliformes da cepa (ATCC 25922) apresentaram maior sensibilidade ao efeito das especiarias do que as cepas selvagens. Os dados são compatíveis com TRAJANO et al. (2009) e BOTRE et al. (2010).

**Tabela 18.** Resultados em Unidade Formadora de Colônia (UFC) de coliformes a 35°C isolados do queijo controle e dos queijos temperados acrescidos de *E. coli* (ATCC 25922).

Amostras	G1 (UFC/g)(x10 <sup>5</sup> )	G2 (UFC/g) (x10 <sup>5</sup> )	G3 (UFC/g) (x10 <sup>5</sup> )	G4 (UFC/g) (x10 <sup>5</sup> )
1	2,8	0,46	0,28	1,20
2	2,0	1,3	0,87	1,20
3	1,7	0,85	0,14	0,75
4	2,0	0,92	0,69	1,10
5	2,5	0,95	1,40	0,86
6	2,0	0,70	1,20	1,20
7	2,3	0,36	1,20	0,84
8	2,0	0,39	0,44	0,96
9	1,5	0,01	1,20	1,20
10	2,8	0,63	0,30	1,10
Média	2,1	0,65	0,65	1,00
Eficiência		69%	69%	52,4%

Onde: G1= Queijo sem tempero (controle); G2 = Queijo com 1% de orégano; G3 = Queijo com 1% de salsinha e G4 = Queijo com 0,5% de orégano + 0,5% de salsinha.

Com os valores observados na Tabela 18 calculou inicialmente a estatística descritiva (Tabela 19). Assim, observaram na Tabela 19 valores próximos entre mediana e média e coeficiente de assimetria dentro da normalidade, confirmando amostras com aparência de normalidade.

Observou que houve diferença no valor de CV entre os grupos analisados. O Grupo 3 apresentou CV de 60,8%, seguido pelo grupo 2 com 56% e o grupo 1 e 4 com 10,1% e 18,47%, respectivamente. Assim, o grupo 3 variou mais em relação à média obtida do que os outros grupos analisados.

Analisando a estatística descritiva, observou-se maior variabilidade para os queijos do grupo 4. O grupo 4 apresentou erro padrão menor em relação aos demais grupos comparados, além de apresentar valores muito diferentes para média aritmética e mediana conforme apresentado na Tabela 19.

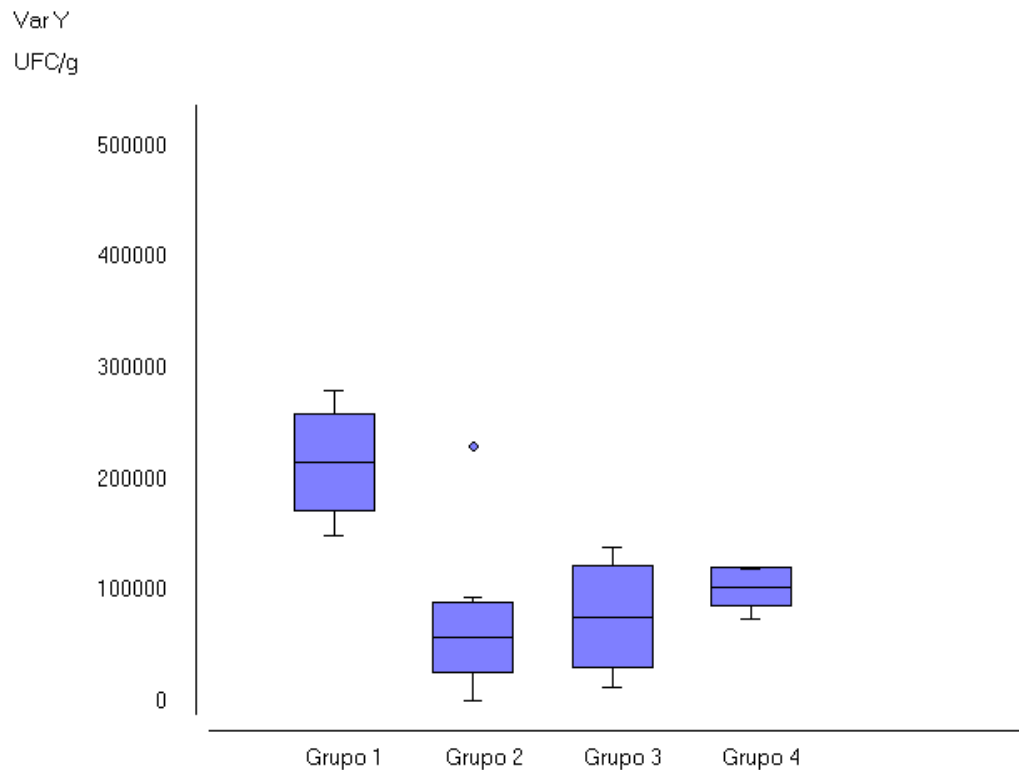


**Tabela 19.** Estatística descritiva da contagem dos coliformes a 35° C isolados dos diferentes grupos de queijos temperados e inoculados com *E. coli* (ATCC 25922).

	<b>G1</b>	<b>G2</b>	<b>G3</b>	<b>G4</b>
Tamanho da amostra	10	10	10	10
Mínimo	1,5x10 <sup>9</sup>	1,5x10 <sup>7</sup>	1,4x10 <sup>8</sup>	7,5x10 <sup>8</sup>
Máximo	2,8x10 <sup>9</sup>	1,3x10 <sup>9</sup>	1,4x10 <sup>9</sup>	1,2x10 <sup>9</sup>
Amplitude total	1,3x10 <sup>9</sup>	1,2x10 <sup>9</sup>	1,2x10 <sup>9</sup>	5,4x10 <sup>8</sup>
Mediana	2,0x10 <sup>9</sup>	6,6x10 <sup>8</sup>	7,8x10 <sup>8</sup>	1,1x10 <sup>9</sup>
Primeiro Quartil (25%)	2,0x10 <sup>9</sup>	4,0x10 <sup>8</sup>	3,3x10 <sup>8</sup>	8,8x10 <sup>8</sup>
Terceiro Quartil (75%)	2,4x10 <sup>9</sup>	9,0x10 <sup>8</sup>	1,2x10 <sup>9</sup>	1,2x10 <sup>9</sup>
Desvio Interquartilico	4,5x10 <sup>8</sup>	4,9x10 <sup>8</sup>	8,9x10 <sup>8</sup>	3,3x10 <sup>8</sup>
Média Aritmética	2,1x10 <sup>9</sup>	6,5x10 <sup>8</sup>	7,8x10 <sup>8</sup>	1x10 <sup>9</sup>
Desvio Padrão	4,3x10 <sup>8</sup>	3,6x10 <sup>8</sup>	4,7x10 <sup>8</sup>	1,9x10 <sup>8</sup>
Erro Padrão	1,3x10 <sup>8</sup>	1,1x10 <sup>8</sup>	1,5x10 <sup>8</sup>	6,2x10 <sup>7</sup>
Coeficiente de Variação	20,14%	55,97%	60,80%	18,47%
Assimetria (g1)	0.2784	-0.0080	-0.0173	-0.4857
Curtose (g2)	-0.7688	0.0493	-1.8520	-1.4989

Onde: G1= Queijo sem tempero (controle); G2 = Queijo com 1% de orégano; G3 = Queijo com 1% de salsinha e G4 = Queijo com 0,5% de orégano + 0,5% de salsinha.

Os dados podem ser verificados na Figura 16 onde se observou que as amostras apresentaram pouca variabilidade dos dados e sem pontos discrepantes. Os grupo 2, 3 e 4 apresentaram níveis de contaminação menores do que o grupo 1, principalmente o grupo 2 (orégano).



**Figura 16.** Resultado das médias, quartis e variabilidade dos dados dos coliformes a 35° C dos queijos elaborados com leite cru acrescido de *E. coli* (ATCC 25922).

Assim em seguida, aplicou-se o teste de normalidade de *Lilliefors* (apêndice 6a), que mostrou distribuição normal permitindo a adoção de comparação múltipla ANOVA e o teste de Tukey.

De acordo com o teste de Tukey representado na Tabela 20, mostrou que houve diferença significativa ( $p < 0,01$ ) entre o queijo sem tempero (controle - Grupo 1) com os demais queijos temperados (1% de orégano - G2, 1% de salsinha - G3 e queijo com 0,5% de orégano acrescido de 0,5% de salsinha - G4). Assim, observou-se que houve diferença significativa entre a amostra controle (queijo sem tempero) com os demais

queijos temperados. No entanto, não houve diferença significativa entre os temperos testados, aceitando-se a hipótese alternativa.

**Tabela 20.** Resultados e significância do teste ANOVA e Tukey da contagem de Unidade Formadora de Colônia dos coliformes a 35°C, isolados dos diferentes grupos de queijo.

Fontes de Variação		GL	SQ	QM
Tratamentos		3	$1,4 \times 10^{11}$	$4,6 \times 10^{10}$
Erro		36	$5,3 \times 10^{10}$	$1,4 \times 10^9$
F	31.5839			
(p)	<0.0001			
Média (G1)	$2,1 \times 10^9$			
Média (G2)	$6,5 \times 10^8$			
Média (G3)	$7,8 \times 10^7$			
Média (G4)	$1,0 \times 10^9$			
<b>Tukey</b>	<b>Diferença</b>	<b>Q</b>	<b>(p)</b>	
Média (G1 a G2)	$1,5 \times 10^9$	12,3546	<0.01	
Média (G1 a G3)	$1,3 \times 10^9$	11,3021	<0.01	
Média (G1 a G4)	$1,0 \times 10^9$	8,9956	<0.01	
Média (G2 a G3)	$1,2 \times 10^8$	1,0525	ns	
Média (G2 a G4)	$4,0 \times 10^8$	3,3590	ns	
Média (G3 a G4)	$2,8 \times 10^8$	2,3065	ns	

Onde: G1= Queijo sem tempero (controle); G2 = Queijo com 1% de orégano; G3 = Queijo com 1% de salsinha e G4 = Queijo com 0,5% de orégano + 0,5% de salsinha. E ns= não significativo.

Os intervalos de confiança 95% para testes bicaudais, para os quatro grupos estão expressos no Apêndice 6b. Assim, verificou que houve diferença significativa da contagem de coliformes a 35°C isolados nos queijos com as especiarias inoculadas com *E. coli* ATCC 25922. Os intervalos dos grupos 2, 3 e 4 se sobrepõem e o intervalo significante é o grupo 1 (Apêndice 6b).

Para a avaliação dos coliformes a 45°C nos queijos produzidos com leite cru acrescentado com *E. coli* (ATCC 25922) foi inicialmente confeccionada na Tabela 21 com os dados originais.

Segundo a Tabela 21, obteve-se uma eficiência do orégano de 97,8% sobre os coliformes a 45° C, seguido de 97,6% de salsinha e 93,6% de orégano mais salsinha. Os dados mostram que as cepas ATCC25922 são mais sensíveis às especiarias testadas do que as cepas selvagens.

**Tabela 21** Valores em Unidade Formadora de Colônia de coliformes a 45°C do queijo produzido com leite cru acrescentado com *E. coli* (ATCC 25922).

Amostras	G1	G2	G3	G4
1	$1,5 \times 10^3$	$1,6 \times 10^2$	$1,0 \times 10^2$	$5,3 \times 10^2$
2	$1,3 \times 10^3$	$1,9 \times 10^2$	$3,1 \times 10^2$	$4,1 \times 10^2$
3	$5,0 \times 10^2$	$1,9 \times 10^2$	$2,7 \times 10^2$	$3,1 \times 10^2$
4	$3,0 \times 10^2$	$1,2 \times 10^2$	$1,8 \times 10^2$	$3,1 \times 10^2$
5	$1,5 \times 10^2$	$1,7 \times 10^2$	$1,9 \times 10^2$	$3,5 \times 10^2$
6	$2,2 \times 10^3$	$1,4 \times 10^2$	$1,6 \times 10^2$	$6,1 \times 10^2$
7	$1,4 \times 10^2$	$1,5 \times 10^2$	$1,8 \times 10^2$	$7,0 \times 10^2$
8	$9,0 \times 10^2$	$4,2 \times 10^2$	$6,0 \times 10$	$9,5 \times 10^2$
9	$2,0 \times 10^2$	0	$2,7 \times 10^2$	$2,1 \times 10^2$
10	$1,6 \times 10^2$	$8,0 \times 10$	$3,0 \times 10$	$3,4 \times 10^2$
Média	$7,3 \times 10^3$	$1,6 \times 10^2$	$1,7 \times 10^2$	$4,7 \times 10^2$
Eficiência		97,8%	97,6%	93,6%

Onde: G1= Queijo sem tempero (controle); G2 = Queijo com 1% de orégano; G3 = Queijo com 1% de salsinha e G4 = Queijo com 0,5% de orégano + 0,5% de salsinha.

Com os valores observados na Tabela 21 calculou inicialmente a estatística descritiva (Tabela 22). Observou que houve diferença no valor de CV entre os grupos analisados. O Grupo 1 apresentou CV de 97,64%, seguido pelo grupo 2 com 66,22% e o grupo 3 e 4 com 52,73% e 47,91%, respectivamente. Assim, o grupo 1 apresentou uma variação maior em relação à média obtida do que os outros grupos analisados.

Analisado a estatística descritiva, observou menores variabilidades para os queijos do grupo 3. O grupo 3 apresentou erro padrão menor em relação aos demais grupos comparados, além de não apresentar valores diferentes para média aritmética e mediana, conforme apresentado na Tabela 22.

**Tabela 22.** Dados da estatística descritiva da contagem dos coliformes a 45°C dos diferentes grupos de queijo inoculados com *E. coli* (ATCC 25922).

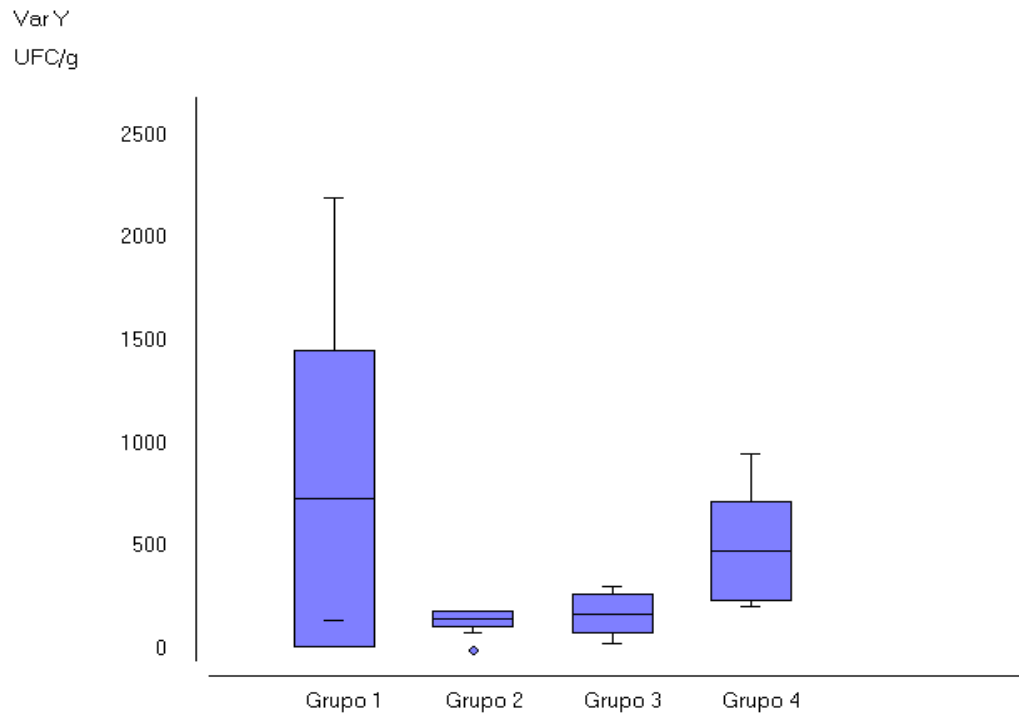
	<b>G1</b>	<b>G2</b>	<b>G3</b>	<b>G4</b>
Tamanho da amostra	10	10	10	10
Mínimo	$1,4 \times 10^2$	0.0	$3 \times 10$	$3,1 \times 10$
Máximo	$2,2 \times 10^3$	$4,2 \times 10^2$	$3,1 \times 10^2$	$9,5 \times 10^2$
Amplitude total	$2,0 \times 10^3$	$4,2 \times 10^2$	$2,8 \times 10^2$	$7,4 \times 10^2$
Mediana	$4,0 \times 10^2$	$1,5 \times 10^2$	$1,8 \times 10^2$	$3,8 \times 10^2$
Primeiro Quartil (25%)	$1,7 \times 10^6$	$1,2 \times 10^6$	$1,1 \times 10^6$	$3,1 \times 10^6$
Terceiro Quartil (75%)	$1,2 \times 10^7$	$1,8 \times 10^6$	$2,5 \times 10^6$	$5,9 \times 10^6$
Desvio Interquartilico	$1,0 \times 10^7$	$6,0 \times 10^5$	$1,3 \times 10^6$	$2,7 \times 10^6$
Média Aritmética	$7,3 \times 10^2$	$1,6 \times 10^2$	$1,7 \times 10^2$	$4,7 \times 10^2$
Desvio Padrão	$7,1 \times 10^2$	$1 \times 10^2$	$9,2 \times 10$	$2,2 \times 10^2$
Erro Padrão	226.9	33.9	29.2	71.5
Coeficiente de Variação	97.64%	66.22%	52.73%	47.91%
Assimetria (g1)	1.1	1.4	-0,1	1,1
Curtose (g2)	0.2	4.2	-0.9	0.8

Onde: G1= Queijo sem tempero (controle); G2 = Queijo com 1% de orégano; G3 = Queijo com 1% de salsinha e G4 = Queijo com 0,5% de orégano + 0,5% de salsinha.

Observou-se no diagrama em caixa representado na Figura 11 uma maior variabilidade para o Grupo 1 (controle) e ponto discrepante para o Grupo 2 (1% de orégano). No entanto, os resultados apresentaram menor variabilidade para os grupos do queijo com 1% de orégano, do queijo com 1% de salsinha e do queijo com 0,5% de orégano e com 0,5% de salsinha. A Figura 11 evidencia que as especiarias testadas são eficientes sobre os coliformes a 45°C, principalmente o orégano a 1%, seguido só da salsinha e depois pelo conjunto das duas especiarias. Assim, foi aplicado o teste de normalidade de *Lilliefors* (Apêndice 6c) que permitiram avaliar a curva normal da adoção do teste de comparação múltipla.

A concepção de sinergismo tem sido o tema central de muitas discussões em fitoquímica. A interação entre os extratos podem representar uma alternativa para potencialidade da ação dos mesmos, porém, muito ainda precisa ser esclarecido. Os resultados do efeito sinérgico entre os extratos de orégano e salsinha representados na Figura 17 mostraram que houve significativa variação entre o comportamento

individual e a combinação, constatando que não ocorreu sinergismo entre os mesmos, na proporção estudada, sobre a *E. coli* (ATCC 25922) testada.



**Figura 17.** Resultados das médias, quartis e variabilidade dos dados do coliformes a 45°C do queijo elaborados com leite cru acrescido de *E. coli* (ATCC 25922).

Observaram-se diferenças significativas quanto a  $p > 0,05$  entre o grupo 4 (0,5% de orégano + 0,5% de salsinha) em relação aos grupos 2 (1% de orégano) e 3 (1% de salsinha) aceitando a hipótese alternativa de que as amostras com especiarias não se comportam como as amostras controle. O intervalo para o grupo 4 não sobrepõe sobre os grupos 2 e 3 denotando diferenças significantes.

Os intervalos de confiança 95% para testes bicaudais, para os quatro grupos foram expressos no Apêndice 6d.

As substâncias químicas das especiarias apresentam compostos capazes de inibir direta ou indiretamente os sistemas enzimáticos bacterianos, mesmo que a maioria dos microrganismos seja ainda desconhecida. Seu comportamento é semelhante ao dos antibióticos, que são definidos como “substâncias químicas com capacidade para matar ou inibir o desenvolvimento de bactérias ou outros microrganismos”. A caracterização da célula “alvo” é decisiva para a aplicação e somente os compostos naturais, que agem sobre sistemas essenciais para a reprodução e sobrevivência desses microrganismos, têm atividade antibiótica. Assim, a inativação dos sistemas no metabolismo celular tem efeitos letais (ERNANDEZ & GARCIA-CRUZ, 2007).

A determinação da concentração ideal que exerça, simultaneamente, efeito antimicrobiano e realçador de sabor e do aroma dos alimentos, é fundamental para a utilização de óleos essenciais de plantas, em substituição aos aditivos sintéticos nos alimentos (FERREIRA, 2003), no entanto com os resultados deste trabalho verificou-se que é importante conhecer a quantidade de cada especiaria que deve ser acrescentado nos alimentos, para que realmente apresentem estas eficiências.

ERNANDES & GARCIA-CRUZ (2007) obtiveram resultado de inibição dos microrganismos testados somente na concentração de 10% nos óleos essenciais testados. Os resultados foram compatíveis com o resultado evidenciando que apenas 1% de extratos de plantas no alimento não seria suficiente para eliminar a carga microbiana do alimento, necessitando estudar outras formas de concentrar estas composições para que ocorra efeito bactericida.

## VI CONCLUSÃO

- Mesmo as amostras que possuíram o número de registro no SIF, apresentaram Número Mais Prováveis (NMP) de coliformes a 45° C e presença de *E. coli*, acima do permitido pela legislação, mostrando que o registro não garantiu a qualidade sanitária, indicando a necessidade de uma fiscalização mais rigorosa durante o processamento desses queijos.
- Os queijos tipo Minas Frescal produzidos na região do Triângulo Mineiro apresentam-se em condições higiênicas insatisfatórias, colocando o consumidor em risco.
- A presença de 3,6% característica de EPEC nos queijos tipo Frescal evidencia que o alimento está insatisfatório para o consumo humano. Há necessidade de alertar os órgãos competentes pela qualidade e segurança do alimento para consumo humano.
- Não foi isolada nenhuma *E. coli* produtora de toxina *stx1*, *stx2* e *eae*;
- Apenas uma estirpe apresentou *afa*, mostrando que as *E. coli* isoladas nos queijos da região do Triângulo Mineiro são de origem comensal.
- O antibiótico mais efetivo, independente do queijo, foi a ciprofloxacina com 100% de sensibilidade e o menos efetivo foi à tetraciclina.
- A maioria das estirpes de *E. coli* testadas apresentaram sensibilidade aos antimicrobianos estudados.
- Não houve diminuição no número das bactérias do grupo coliformes a 35°C isolados do queijo produzidos com leite cru com a utilização de especiarias (orégano e salsinha).
- Houve diminuição significativa das bactérias do grupo coliformes a 45°C isolados do queijo produzidos com leite cru com a utilização de especiarias (orégano e salsinha).



↻ Houve diminuição significativa do número de bactérias do grupo coliformes a 35°C e a 45°C isolados do queijo produzidos com leite inoculado com *E. coli* ATCC 25922 com as especiarias (orégano e salsinha).

## VII REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABREU, D.L.da.C.; FRANCO, R.M.; NASCIMENTO, E.R.do.; PEREIRA, V.L.de.A.; ALVES, F.M.X.; ALMEIDA, J.F.de. Perfil de sensibilidade antimicrobiana e detecção do gene *ISS* pela reação em cadeia da polimerase na tipificação de *Escherichia coli* patogênica em codornas de corte sob inspeção sanitária. **Pesq. Vet. Bras.** v.30, n.5, p.406-410, maio 2010.
- ADSERSEN, A.; GAUGUIN, B.; GUDIENSEN, L.; JÄGER, A.K. Screening of plants used in Danish folk medicine to treat memory dysfunction for acetylcholinesterase inhibitory activity. **J. Ethnopharm.**, v. 104, p. 418-422, 2006.
- ALBUQUERQUE, I.P.S. & RODRIGUES, M.A.M. Qualidade microbiológica do queijo tipo mussarela artesanal comercializado em Uberlândia, MG. São Paulo: **Rev. Hig. Alimentar**, v. 22, n. 162, p. 101-105, jun., 2008.
- 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. **Arq. Bras. Méd. Vet. Zootec.** v. 54, n.4, p. Belo Horizonte. jul/ago, 2002.
- AL-HOWIRINY, T. AL-SOHAIBANI, M.; EL-TAHIR, K.; RAFATULLAH, S. Prevention of experimentally-induced gastric ulcers in rats by an ethanolic extract of “parsley” *Petroselinum crispum*. **Amer. J. Chin. Med.**, v.31, p.699-711, 2003.
- ALMEIDA FILHO, E.S. & NADER FILHO, A. Ocorrência de coliformes fecais e *Escherichia coli* em queijo tipo Minas frescal de produção artesanal, comercializado em Poços de Caldas, MG. São Paulo: **Rev. Hig. Alimentar**, v. 16, n.102/103, p. 71-73, 2002.
- ALMEIDA, M.D.C.de.; PENA, R.da S.; LIMA, C.L.S. Avaliação da padronização e das condições higiênico-sanitárias de queijos produzidos no Estado do Pará. São Paulo: **Rev. Hig. Alimentar**, v. 19, n.137, p. 104-107, nov./dez., 2005.
- ALMEIDA, P.M.P. de. & FRANCO, R.M. Avaliação bacteriológica de queijo tipo Minas Frescal com pesquisa de patógenos importantes à Saúde Pública: *Staphylococcus aureus*, *Salmonella sp* e Coliformes Fecais. São Paulo: **Rev. Hig. Alimentar**. v.17, n.111, p. 79-85. ago, 2003.
- AMATO NETO, V. & MENDONÇA, L. **Antibióticos na prática médica.** 4 ed. São Paulo: Roca, 1994, 283p.

AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION. **Control of Communicable Diseases Manual**. Abram S. Benenson, Ed. 16 th Edition, 1995, p.147-150.

AMMON, A. Vigilância das infecções por *E. coli* enterohemorrágica (ECEH) e do síndrome hemolítico-urêmico (SHU) na Europa. **Eurosurv. monthly**, v. 2, n.12, p. 91-96, dec. 1997.

ANUALPEC. **Anuário da Pecuária Brasileira**, AgraFNP, 2009, 360p.

ARAÚJO, W.N.de; SILVA, M.H.; MARTINEZ, T.C.N.; SILVA, A.V.A.F.; SILVEIRA, V.F.da.; BARROS, S.L.B. Determinação do nível de contaminação por coliformes totais no queijo Minas comercializado na Região Metropolitana de Salvador – Bahia. **Rev. Bras. Saúde Prod. An.** v. 2, n.1, p. 5-9 , 2001<sup>a</sup>.

ARAÚJO, W.N.; SILVA, M.N.; MARTINEZ, T.C.; SILVEIRA, V.F.; BARROS, S. L.B.; SILVA, A.V.A.F. Isolamento e identificação de coliformes no queijo Minas comercializados na região metropolitana de Salvador/Bahia. **Rev. Bras. Saúde Prod. An.**, v. 2, n. 2, p. 37-42, 2001<sup>b</sup>.

ARAÚJO, V.S.de.; SANTOS, E.C.S.; QUEIROZ, M.L.P.; FREITAS, A.C. Análise bacteriológica do queijo Minas Frescal comercializado na cidade do Rio de Janeiro. In: Congresso Brasileiro de Microbiologia, 19. Rio de Janeiro, 1997, **Anais...** Rio de Janeiro: SBM, 1997, p. 283 (resumo).

ÁVILA, F.A.; SCHOCHEN-ITURRINO, R.P.; LALLIER, R.; FAIRBROTHER, J.M. JACQUES, M. A new fimbrial antigen on *E. coli* strains isolated from diarrheic Zebu (*Bos indicus*) calves with diarrhea in Brazil. **Vet. Rec.**, v. 123, p. 80-81, 1988.

BARBOSA, J.A.A.; OLIVEIRA, F.G.da.S.; BELÉM, L.de.F.; MEDEIROS, A.C.D.de. Riscos de utilização de aminoglicosídeos em pacientes oncológicos. **Lat. Am. J. Pharm.** v. 27, n. 6, p. 812-819, 2008.

BARBOSA, L.; JORGE, A.O.C.; UENO, M. Incidência de *Staphylococcus* coagulase positiva em leite tipo C e sensibilidade das cepas aos antibióticos. **Rev. Hig. Alimentar.** v.21, n. 148, p. 105 – 109. jan./fev, 2007.

BARROS, P.C.O.G.de.; NOGUEIRA, L.C.; RODRIGUEZ, E.M.; CHIAPPINI, C.C. deJ. Avaliação da qualidade microbiológica do queijo Minas Frescal comercializado no município do Rio de Janeiro, RJ. São Paulo: **Rev. Hig. Alimentar**, v. 18, n.122, p. 57-61, jul, 2004.

BEHMER, M.L.A. **Tecnologia do leite: leite, queijo, manteiga, caseína, iogurte, sorvete e instalações: produção, industrialização, análise**. 13 ed. São Paulo: Nobel, 1999. 322p.

BERGAMINI, A.M.M.; SIMÕES, M.; TRINO, K.; GOMES, T.A.T.; GUTH, B.E.C. Prevalence and characteristics of shiga-producing *Escherichia coli* (STEC) strains in ground beef in São Paulo, Brazil. **Braz. J. Microbiol.** v.38, p.553-556, 2007.

BERTINI, L.M.; PEREIRA, A.F.; OLIVEIRA, C.L.de.L.; MENEZES, E.A.; MORAIS, S.M.de.; CUNHA, F.A.; CAVALCANTI, E.S.B. Perfil de sensibilidade de bactérias frente a óleos essenciais de algumas plantas do nordeste do Brasil. **Infarma**, v.17, n.3/4, p.80-83, 2005.

BHAGWAT, A.A. Simultaneous detection of *Escherichia coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes* and *Salmonella* strains by real-time PCR. **Food Microbiol.** v.84, p.217-224, 2003.

BLACK, J.G. **Microbiologia: fundamentos e perspectivas**. 4 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002, 829p.

BLANCO M.; BLANCO, J.E.; ALONSO, M.P.; MORA, A.; BALSALOBRE, C.; MUÑOA, F.; JUAREZ, A.; BLANCO, J. Detection of *pap*, *sfa* and *AFA* adhesin-encoding operons in uropathogenic *Escherichia coli* strains: relationship with expression of adhesions and production of toxins. **Rev. Microbiol.**, v.148, p.745-755, 1997.

BLANCO, M.; BLANCO, J. E.; MORA, A.; REY, J.; ALONSO, J. M.; HERMOSO, M.; HERMOSO, J.; ALONSO, M. P., DAHBI, G.; GONZALEZ, E. A.; BERNÁRDEZ, M. I.; BLANCO, J. Serotypes, virulence genes and intimin types of shiga toxin (verotoxin) – Producing *E. coli* isolates from healthy sheep in Spain. **J Clin Microbiology**. v.41, n.4, p.1351-1356, apr., 2003.

BLANK, T.E.; LAUCHER, D.W.; SCALETSKY, I.C.A.; ZHONG, H.; WHITTAM, T.S.; DONNENBERG, M.S. Enteropathogenic *Escherichia coli* O157 strains from Brazil. **Emerg. Infect. Dis.** n.1, p.113-115, 2003.

BOMONO, R.A. & SZABO, D. Mechanisms of multidrug resistance in *Acinetobacter* species, *Pseudomonas aeruginosa*. **Clin Infect Dis**; v. 43, p. 49-56, 2006.

BORGES, L.J.; AMORIM, L.J.M.; DANTAS, M.C.; ANDRÉ, P.B.; CAMPOS, M.R.H.; SERAINI, A.B. Qualidade microbiológica de empadão goiano comercializado em uma feira de lazer de Goiânia/GO e teste de susceptibilidade a antimicrobianos de cepas isoladas. **Rev. Patolog. Trop.** v.37, n.2, p.131-142, 2008.

BORGES, M.de.F.; FEITOSA, T.; NASSU, R.T.; MUNIZ, C.R.; AZEVEDO, E.H.F.de.; FIGUEIREDO, E.A.T.de. Microrganismos patogênicos e indicadores em queijo de coalho produzido no estado do Ceará, Brasil. **B. Ceppa**, Curitiba, v.21, n.1, p.31-40, jan./jun. 2003.

BOROWSKY, L.M.; BESSA, M.C.; CARDOSO, M.de.I.; AVANCINI, C.A.M. Sensibilidade e resistência de amostras de *Salmonella Typhimurium* isoladas de suínos abatidos no Rio Grande do Sul/Brasil frente aos desinfetantes quaternários de amônio e iodoform. **Ciênc. Rural**, Santa Maria, v. 36, n.5, p.1474-1479, set./out, 2006.

BRASIL. Leis, Decretos, etc. Resolução RDC 12 de 02 de Janeiro de 2001. Aprova o regulamento técnico sobre padrões microbiológicos para alimentos. **Diário Oficial da União**, Brasília – DF, n.7 – E, seção 1, p. 45-53, 10 de janeiro de 2001.

BRASIL. Ministério da Agricultura e do Abastecimento. Decreto nº 30.691, de 29 de março de 1952, alterado. Regulamento da Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal. Brasília: MA, 1997<sup>a</sup>.

BRASIL. Ministério da Agricultura e do Abastecimento. Portaria nº 352, de 4 de setembro de 1997. Regulamento técnico para Fixação de Identidade e qualidade do queijo Minas Frescal. Brasília: MA, 1997<sup>b</sup>.

BRASIL. Ministério da Agricultura. Departamento Nacional de Inspeção de Produtos de Origem Animal. Regulamento da Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal (RISPOA). Brasília, 1974.

BRITO, B.G.de.; TAGLIARI, K.C.; PIFFER, I.A. Caracterização da virulência da cepa de *Escherichia coli* – BK99. **Cienc. Rural**, v. 31, n.3, Santa Maria, maio/jun, p. 455-459, 2001.

BRITO, M.C.; SILVA, J.de.A.; OLIVEIRA, M.de F.M.de.; COUTINHO, H.D.M. Características epidemiológicas da *Escherichia coli* Enterotoxigênica (ETEC) e de outras *E. coli*. **Rev. Hig. alimentar**, v.20, n.146, p.43-48, nov, 2006.

BROTE, D.A.; SOARES, N.de.F.F.; ERPITIA, P.J.P.; SOUSA, S.de.; RENHE, I.R.T. Avaliação de filme incorporado com óleo essencial de orégano para conservação de pizza pronta. **Rev. Ceres**, v.57, n.3, p.283-291, mai/jun., 2010.

BUCHANAN, R.L. & DOYLE, M.P. Foodborne disease significance of *Escherichia coli* O157:H7 and other enterohemorrhagic *Escherichia coli*. **Food Techn.** v.51, n.10, p.69-76, out, 1997.

BURTON, G.R.W. & ENGELKIRK, P.G. **Microbiologia: para as Ciências da Saúde**. 7 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2005. 426p.

CAMPOS, M.R.J.H.; KIPNIS, A.; ANDRÉ, M.C.D.P.B.; VIEIRA, C.A.da. S.; JAYME, L.B., SANTOS, P.P. SERAFINI, A.B. Caracterização fenotípica pelo antibiograma de cepas de *Escherichia coli* isoladas de manipuladores, de leite cru e de queijo “Minas Frescal” em um laticínio de Goiás, Brasil. **Ciênc. Rural**, Santa Maria, v.36, n.4, p. 1221-1227, jul./ago, 2006.

CARDOSO, P.A. Ocorrência de cepas de *Escherichia coli* que apresentam o gene de shiga toxina em queijo mussarela produzido artesanalmente. Jaboticabal: UNESP, 2009. 75p. Dissertação – Programa em Pós Graduação em Microbiologia Agropecuária, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinária. Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2009.

CARDOSO, L. & ARAÚJO, W.M.C. Parâmetros de qualidade em queijos comercializados no Distrito Federal, no período de 1997-2001. São Paulo: **Rev. Hig. Alimentar.** v. 18, n.123, p. 49-53 ago, 2004.

CARVALHO, E.P. MOCHEL, A.C.; LEAL, D.D.M. Qualidade do queijo “Minas frescal” comercializados em feiras livres. In: CONGRESSO NACIONAL DE LATICÍNIOS, 14, Juiz de Fora, 1996. **Anais....** Juiz de Fora, p. 111-118, 1996.

CARVALHO, H.H.; WIEST, J.M.; GRECO, D.P. Atividade antibacteriana e a preditividade do condimento *Artemísia dracuncululus* Linn. (Asteraceae), variedade inodora – estragão -, frente à *Salmonella* sp. **Ciênc. Tecnol. Aliment.** V. 26, n.1, Campinas, jan./mar, 2006.

CERQUEIRA, A.M.M.F.; GUH, B.E.C.; JOAQUIM, R.M.; ANDRADE, J.R.C. High occurrence of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) in healthy cattle in Rio de Janeiro State, Brazil, **Vet. Microbiol.**, v. 70, p. 111-121, 1999.

CHINA, B.; PIRSON, V.; MAINIL, J. Typing of bovine attaching and effacing *Escherichia coli* by multiplex in vitro amplification of virulence-associated genes. **Appl. and Environ. Microbiol.**, v.62, p.3462-3465, 1996.

COBBOLD, R. & DESMARCHELIER, P. A longitudinal study of shiga-toxigenic *Escherichia coli* (STEC) prevalente in three Australian dairy herds. **Veter. Microbiol.**, v.71, p. 125-137, 2000.

COLEN, G.; PEREIRA, M.L.; CARMO, L.S. Avaliação microbiológica do leite tipo C e queijo tipo “Minas” comercializados em Belo Horizonte. In: CONGRESSO NACIONAL DE LATICÍNIOS, 7. Juiz de Fora, 1996. **Anais...s.p.** 1984.

CORREIA, M.; DAROS, V.S.M.G.; SILVA, R.P. Matérias estranhas em canela em pó e páprica em pó, comercializadas no estado de São Paulo. **Ciênc. e Tecnol. de Aliment.** v.20 n.3 Campinas Sept./Dec. 2000.

DEGASPARI, C.H.; WASCZYNSKYJ, N.; PRADO, M.R.M. Atividade antimicrobiana de *Schinus terebenthifolius* Raddi. **Ciênc. Agrotec.** Lavras, v.29, n.3, p.617-622, maio/jun., 2005.

DIAS, R.S.; SILVA, S.O.; SOUZA, J.M. Surtos de toxinfecção alimentar provocados por queijos comercializados em Minas Gerais, no período de 1992 a 1994. In: CONGRESSO NACIONAL DE LATICÍNIOS, 7. Juiz de Fora, 1996. **Anais....**, 1995, p. 143-144.

DIAS, J.C.de.A.R. & HOFER, E. Bactérias Gram-negativas resistentes a antimicrobianos em alimentos. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro. v.80, n.4, p 411-421, out/dez, 1985.

DUARTE, D.A.; SCHUCH, D.M.T.; SANTOS, S.B.; RIBEIRO, A.R.; VASCONCELOS, A.M.M.; SILVA, J.V.D.; MOTA, R.A.da. Pesquisa de *Listeria monocytogenes* e microrganismos indicadores higiênico-sanitários em queijo de coalho produzido e comercializado no estado de Pernambuco. **Arq. Inst. Biol.**, São Paulo, v. 72, n.3, p. 297-302, jul./set., 2005.

DRUBI, A.J. & ÁVILA, F. A.de. Estudo bacteriológico de matérias primas de origem animal, utilizadas na fabricação de alimentos, na região de Ribeirão Preto, SP. **Rev. Hig. Alimentar**, São Paulo, v.21, n.148, p.97-103, jan./fev., 2007.

ERNANDES, F.M.P.G & GARCIA-CRUZ, C.H. Atividade antimicrobiana de diversos óleos essenciais em microrganismos isolados do meio ambiente. **B. CEPPA**, Curitiba, v. 25, n. 2, p. 193-206, jul./dez, 2007.

ESQUIVEL, A.S. Magia e mistério: condimentos e especiarias temperando alimentos e criando sedução à mesa. **Rev. Nutr. Saude Perform.**, São Paulo, v.3, p.42-46, ago./set. 2001.

FARDIN, F.L.; ROGGIA, I.; ZARDETH, J.K.M.A.H. Pesquisa de coliformes totais e fecais em queijos coloniais produzidos na região central do Rio Grande do Sul. **Rev. Hig. Alimentar**, v.22, n.165, p.82-85, out. 2008.

FEITOSA, T.; BORGES, M.de.F., NASSU, R.T., AZEVEDO, E.H.I.de., MUNIZ, C.R. Pesquisa de *Salmonella sp*, *Listeria sp* e microrganismos indicadores higiênico-sanitários em queijos produzidos no estado do Rio Grande do Norte. **Ciênc. Tecnol. Aliment.** Campinas, v. 23. suppl., p. 162-165. dec, 2003.

FERNANDES, A.M.; ANDREATTA, E.; OLIVEIRA, C.A.F.de. Ocorrência de bactérias patogênicas em queijos no Brasil: questão de Saúde Pública. **Rev. Hig. Alimentar**, São Paulo, v.20, n.144, p.4-56, set., 2006.

FERREIRA, A.C. Uso de açafrão (*Curcuma longa* L.) na redução de *Staphylococcus aureus* ATCC 12600 em ricota (Dissertação – metrado em Ciências dos Alimentos), 2003. UFLA: Lavras, 76p.

FILIPPSEN, L.F.; RIBEIRO, J.; LEITE, D.M.G. Perfil de resistência e sensibilidade antimicrobiana de amostras de *Escherichia coli* isoladas de leitões com diarreia criados ao ar livre na região sudoeste do Paraná, Brasil. **Veterin. notícias**, Uberlândia, v. 11, n.1, p. 53-58, 2005.

FLORES, Q.E.; VELASCO, A.P; FIGUEIROA, A.N.; GIMENG, T.A. Aceites essenciais com propriedades antimicrobianas. **Biofarbo**. v.7, n.7, p.5-8 dec, 1999.

FRANCO, B.D.G.M.; GUTH, B.E.; TRABULSI, L.R. Isolamento e características de cepas de *Escherichia coli* enteropatogênicas isoladas de alimentos. **Rev. de Microbiol.:** Rio de Janeiro, p. 7-53, 1985.

FRANCO, J.; NAKASHIMA, T.; FRANCO, L.; BOLLER, C. Composição química e atividade antimicrobiana *in vitro* do óleo essencial de *Eucalyptus cinérea* F. Mull. ex. *Benth., Myrtaceae*, extraído em diferentes intervalos de tempo. **Rev. Bras. de Farmacogn.**, v.15, v.3, p. 191-194, jul./set, 2005.

FRANCO, B.D.G.de.M. & LANDGRAF, M. **Microbiologia dos alimentos**. São Paulo: Ed. Atheneu, 1996. 182p.

FRANK, J.F. & MARTH, E.H. Survey of soft and semisoft cheese for presence of fecal coliforms and serotypes of *Enteropathogenics Escherichia coli*. **J. Food Protect.** v.41, n.3, p.198-200, mar.1978.

FRAZIER, W.C. **Microbiologia de los alimentos**. Zaragoza: Acribia, 1992, 512p.

FURLANETO, L. & MENDES, S. Análise microbiológica de especiarias comercializadas em feira livre e em hipermercados. **Alim. Nutr.** v.15,n.2, p.87-91, 2004.

GALES, A.C.; PIGNATARI, A.C.; JONES, R.N.; BARETTA, M.; SADER, H.S. Avaliação da atividade *in vitro* dos novos antimicrobianos da classe das fluoroquinolonas, cefalosporinas e carbapenes contra 569 amostras clínicas de bactérias gram-negativas. São Paulo: **Rev. Assoc. Med. Bras.** v. 43, n.2, p.137-144. apr./jun, 1997.

GILMAN, A.G.; RALL, T.W.; NIES, A.S.; TAYLOR, P. **GOODMAN & GILMAN'S. The pharmacological basis of therapeutics**. New York: McGraw Hill., 1996.

GUERRA, N.B. & LAJOLO, F.M. Ação antioxidante de especiarias face diferentes atividades de água. **Ciênc. Tecnol. Aliment.** v.5, n.1, Campinas, p.45-50, jan/mar, 2005.

GROZDANOV, L.; RAASCH, C.; SCHULZE, J.; SONNENBORN, U.; GOTTSCHALK, G.; HACKER, J.; DOBRINDT, U. Analysis of the genome structure of the Nonpathogenic Probiotic *Escherichia coli* strain nissle 1917. **J. Bacteriol.** v. 186, n.16, p.5432-5441, 2004.



GUSTAFSON, R.H. Use of antibiotic in livestock and human health cancers. **J. Dairy Sci** v.27, p.1428-1432, 1992.

GYLES, C.L.; *Escherichia coli* cytotoxins and enterotoxins. **Can. J. Microbiol.** V. 36, p. 734-746, 1992.

HAIDA, K.S., PARZIANELLO, L., WERNER, S., GARCIA, D.R., INÁCIO, C.V. Avaliação in vitro da atividade antimicrobiana de oito espécies de plantas medicinais. **Arq. Ciênc. Saúde Unipar**, Umuarama, v. 11, n. 3, p. 185-192, set./dez. 2007.

HARVEY, R.A.; CHAMPE, P.C.; FISCHER, B.D. **Microbiologia ilustrada**. 2 ed. Porto Alegre: Artmed, 2008. 448p.

HOBBS, B.C. & ROBERTS, D. **Toxinfecções e Controle Higiênico-Sanitário de Alimentos**. São Paulo: Ed. Varela, 1999. 425 p.

HOFFMANN, F.L.; GONÇALVES, T.M.V.; COELHO, A.R.; HIROOKA, E.Y.; HOFFMANN, P. Qualidade microbiologia de queijos ralados de diversas marcas comerciais, obtidos do comércio varejista do município de São José do Rio Preto, SP. São Paulo: **Rev. Hig. Alimentar**, v. 18, n.122, p. 62-66, jul. 2004.

INDU, M.N.; HATHA, A.A.M. ; ABIROSH, C. ; HARSHA, U. ; VIVEKANANDAN, G. Antimicrobial activity of some of the south-Indian spices against serotypes of *Escherichia coli*, *Salmonella*, *Listeria monocytogenes* and *Aeromonas hydrophila*. **Braz. J. Microbiol.** v. 37, n.2,p. 153-158. abr./jun, 2006.

INTERNACIONAL COMMISSION ON MICROBIOLOGICAL SPECIFICATION FOR FOODS-ICMSF. **Microorganismos de los alimentos/Técnica de analyses microbiológicas**. 2 ed. Zaragoza, v. 1, p.341, 1983.

IRINO, K.; KATO, M.A.M.F.; VAZ, T.M.I.; RAMOS, I.I.; SOUZA, M.A.C.; CRUZ, A.S.; GOMES, T.A.T; VIEIRA, M.A.M.; GUTH, B.E.C. Sorotype and virulence markers of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) isolated from dairy cattle in São Paulo, Brazil. **Vet. Microbiol.**, v. 105, p.29-36, 2005.

ISEPON, J.dos.S.; SANTOS, P.A. dos; SILVA, M.A.P.da. Avaliação microbiológica de queijos Minas Frescal comercializados na cidade de Ilha Solteira, SP. São Paulo: **Rev. Higiene Alimentar**, v. 17, n.106, p. 89-94, mar. 2003.

JOHNSON, J.R. Virulence factors in *Escherichia coli* urinary tract infection. **Clin. Microbiol. Rev.**, v.4, p.80-128, 1991.

JOHNSON, J.R.; STELL, A.L.; DELAVARI, P. Canine feces as a reservoir of extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*. **Infection and Immunity.**, v. 69, p. 1306-1314, 2001<sup>a</sup>

JOHNSON, J.R.; DELAVARI, P.; KUSKOWSKI, M.; STELL, A.L. Phylogenetic distribution of extraintestinal virulence-associated traits in *Escherichia coli*. **J. Infect. Dis.**, v.183, p.78-88, 2001<sup>b</sup>

JOHNSON, J.R.; RUSSO, T.A. Extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*: "The other bad *Escherichia coli*". **J. Lab. Clin. Med.**, v.139, n.3, p.155-162, 2002.

KAPER, J.B.; NATARO, J.P.; MOBBLEY, H.L.T. Pathogenic *Escherichia coli*. **Nature Rev.** v.2, p. 123-140, 2004.

KATZUNG, B.G. **Farmacologia básica & clínica.** 8 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2003, 1054p.

KESKIMAKI, M.; MATILLA, L.; PELTOLA, H.; SIITONEN, A. EPEC, EAC and STEC instool specimens: Prevalence and molecular epidemiology of isolates. **Diagnostic Microbiology Infectious Disease**, n.40, p.151-156, 2001.

KIM, J.; MARSHALL, M.R.; WEI, C. Antibacterial activity of some essential oil components against five foodborne pathogens. **J. Agric. Food. Chem.** V.43, p.2839-2845, 1995.

KONEMAN, E.W.; ALLEN, S.D.; JANDA, W.M.; SCHRECKENBERGER, P.C.; WINN JUNIOR, W.C. **Diagnóstico Microbiológico.** 5. ed. Rio de Janeiro: Medsi, 2001.

KOTTWITZ, L.B.M. & GUIMARÃES, I.M. Avaliação microbiológica de queijos coloniais produzidos no Estado do Paraná. São Paulo: **Rev. Hig. Alimentar.** v.17, n.114/115, p.77-80, 2003.

LAICINI, Z.M. Avaliação dos laudos analíticos das amostras de alguns tipos de queijos recebidos pelo Instituto Adolfo Lutz de Ribeirão Preto. **Ver. Instit. Adolfo Lutz**, v. 53, p.17-20, 1993.

LÁZARO, N.dos.S.; FARIAS, R.de.S.; RODRIGUES, D.dos.P.; HOFER, E. *Enterobacteriaceae* oriundas de fonte humana e animal: produção de enterotoxina termoestável e nível de resistência a antimicrobianos. São Paulo: **Rev. Hig. Alimentar.** v. 12, n. 64, p. 49 – 55. set. 1999.

LE BOUGUENEC, C.; ARCHAMBAUD, M.; LABIGNE, A. Rapid and specific detection of the pap, afa, and sfa adhesion-encoding operons in uropathogenic *Escherichia coli* strains by Polymerase Chain Reaction. **J. Clin. Microbiol.**, v.30, n.5, p.1189-1193, 1992.

LEITE, M.M.D.; LIMA, M.G.; REIS, R.B. dos. Ocorrência de *Staphylococcus aureus* em queijo Minas tipo Frescal. São Paulo: **Rev. Hig. Alimentar**, v. 19, n.132, p. 89-93, jun. 2005.

LEOMIL, L.; AIDAR,-UGRINOVICH, L.; GUTH, B.E.C.; IRINO, K.; VETLTORATO, M.P.; ONUMA, D.L.; CASTTRO, A.F.P. Frequency of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) isolates among diarrheic and non-diarrheic calves in Brazil. **Vet. Microbiol.** V. 97, p. 103-109, 2003.

LI, M.; ROSENSHINE, I.; TUNG, S.L.; WANG, X.H.; FRIEDBERG, D.; LEUNG, C.L.H. Comparative proteomix analysis of extracellular proteins of enterohemorrhagic and Enteropathogenic *Escherichia coli* ST their *ihf* and *ler* mutants. **Appl. and Environm. Microbiol.**, n. 70, v. 9, p. 5274-5282, sep. 2004.

LIRA, W.M.; MACEDO, C.; MARIN, J.M. The incidence of shiga toxin-producing *Escherichia coli* in cattle with mastitis in Brazil. **J. Appl Microbiol.** Oxford, n.97, p.861-866, 2004.

LOGUERCIO, A.P. & ALEIXO, J.A.G. Microbiologia de queijo tipo Minas Frescal produzido artesanalmente. **Ciênc. Rural.** Santa Maria v. 31, n.6, p. 1063-1067, 2001.

MANTILLA, S.P.S.; FRANCO, R.M.; OLIVEIRA, L.A.T.de.; GOUVÊA, R. Resistência antimicrobiana de bactérias do gênero *Listeria spp* isoladas de carne moída bovina. **Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.**, São Paulo, v.45, n.2, p. 116-121, 2008.

MARTINS, S.C.; LIMA, J.R.de.; ALMADA, J.da.S.; PREIRA, A.J.B. "Screening" de linhagens de *Escherichia coli* multiresistentes a antibióticos em alimentos de origem animal no estado do Ceará, Brasil. **Rev. Hig. Alimentar**, São Paulo, v.17, n.104/105, p.71-76, jan./fev., 2003.

MENDONÇA, A.T. Efeito dos óleos essenciais de condimentos sobre o crescimento de *Staphylococcus aureus* em ricota cremosa. (Tese de doutorado. Lavras: UFLA, 2004) 72p.

MENEZES, E.A.; MACEDO, F.V.V.; CUNHA, F.A.; ANDRADE, M.do S.de.S.; ROCHA, M.V.A.de.P. Perfil de infecção e resistência aos antimicrobianos de bacilos Gram negativos não fermentadores isolados no Laboratório de Patologia Clínica Dr. Edílson Gurgel, Santa Casa de Misericórdia de Fortaleza – CE. **RBAC** v. 36, n.4, p. 209 – 212, 2004.

MENG, J.; FENG, P.; DOYLE, M.P. Pathogenic *Escherichia coli*. In: DOWNES, F.P.; ITO, K. **Compendium of Methods for the Microbiological Examinations of foods.** 4 ed., Washington: APHA, 2001, cap.35, p.331-341.

MONTELLI, A.C. & SADATSUNE, T. Antibioticoterapia para o clínico. **SMB: Soc. Bras. de Microbiol.** Rio de Janeiro, p. 07 – 53, 2001.

MOREIRA, C.N.; PEREIRA, M.A.; BROD, C.S.; RODRIGUES, D.P.; CARVALHO, J.B.; ALEIXO, J.A.G. Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) isolated from healthy dairy cattle in southern Brazil. **Vet. Microbiol.**, v. 93, p.179-183, 2003.

MOSSEL, D.A.A.; VAN DER ZEE. H.; HARDON, A.P., VAN NETTEN, P. The enumeration of thermotrophic types amongst the *Enterobacteriaceae* colonizing perishable foods. **J. Appl. Bacteriol.**, v.60, p.289-295, 1986.

MOTA, R.A.; SILVA, K.P.C. da; FREITAS, M.F.L.de; SILVA, L.B.G.da. Utilização indiscriminada de antimicrobianos e sua contribuição a multirresistência bacteriana. **Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.** São Paulo, v. 42, n.6, p.465-470, 2005.

NASCIMENTO, A.R.; MOUCHREK FILHO, J.E.; MARTINS, A.G.L. de.A.; SERRA, J.L. Ocorrência de espécies da família *Enterobacteriaceae* em espetinhos de queijos comercializados nas praias de São Luís-MA. **Rev. Hig. Alimentar** v.23, n.178/179, p. 127-131, nov./dez, 2009.

NASCIMENTO, A.R.; CARVALHO, E.P.; FURTADO NETO, M.A.de.A.; MARTINS, A.G.L.A.; VIEIRA, R.H.S.dos.F. Atividade antibacteriana dos óleo essenciais frente a bactérias isoladas de sururu, *Mytella falcata*. **Arq. Ciênc. Marc.**, Fortaleza, v.40, n.2, p. 47-54, 2007.

NASCIMENTO, A.R.; MOUCHREK FILHO, J.E.; MOUCHEREK FILHO, V.E.; MARTINS, A.G.L.A.; MARINHO, S.C.; SERRA, C.L.M.; ALVES, L.M.C. Avaliação da sensibilidade de antimicrobianos a cepas de *Enterobacteriaceae* isoladas de amostras de alface (*Lactuca sativa*) comercializada na cidade de São Luis – MA. **B.CEPPA**. Curitiba, v. 23, n. 2, p.265-272, jul./dec, 2005.

NASCIMENTO, M.da G.F. do & NASCIMENTO, E.R.do. **Importância da avaliação microbiológica na qualidade e segurança dos alimentos**. Seropédica: Embrapa Agrobiologia, dez. 2000. 11p. (Embrapa-CNPAB. Documentos, 120).

NASCIMENTO, D.do; SABIONI, J.G.; PIMENTA, N. Frequência de *Escheria coli* enteropatogênica clássica (EPEC) e enteroinvasiva (EIEC) em queijo tipo Minas Frescal da cidade de Ouro Preto, MG. **Rev. Microb.** São Paulo: v.19, n.3, p.258-261, 1988.

NATARO, J.P.; KAPER, J.B.; Diarrheagenic *Escherichia coli*. **Rev. Clin. Microbi.** v. 11, p. 142-201, 1998.

NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS (NCCLS.), **Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically**, 5a ed. Wayne, Pa., M2-A8. v.23, n.1, 2003.

NICOLAU, E.S.; MESQUITA, A.J.de.; BORGES, G.T.; KUAYE, A.Y. *Staphylococcus aureus* no processamento de Queijo Mussarela: detecção e avaliação da provável origem das linhagens isoladas. São Paulo: **Rev. Hig. Alimentar**. v. 18, n.125, p. 51-56 out, 2004.

NOVAIS, T.S.; COSTA, J.F.O.; DAVID, J.P.L.; DAVID, J.M.; QUEIROZ, L.P.; FRANÇA, F.; GIULIETTI, A.M.; SOARES, M.B.P.; SANTOS, R.R. Atividade antibacteriana em alguns extratos de vegetais do semi-árido brasileiro. **Rev. Bras. Farmacogn**. V. 13, supl.2, p. 05-08, 2003.

OLIVA, C.A.G.; SCALETSKY, M.B.de.M.; FAGUNDES NETO, U. Diarréia aguda grave associada à *Escherichia coli* enteropatogênica clássica (EPEC): características clínicas e perdas fecais em lactentes hospitalizados. **Rev. Ass. Med. Brasil** v. 43, n.4, p.283-289, 1997.

OLIVEIRA, C.A.F.; MORENO, J.F.G.; MESTIERI, L. GERMANO, P. Características físico-químicas e microbiológicas de queijo Minas Frescal e mussarela, produzidos em algumas fábricas de laticínios do Estado de São Paulo. São Paulo: **Rev. Hig. Alimentar**. v. 12, n.55, p.31-35, 1998.

OLIVEIRA, M.M.A.; NUNES, I.F.da. S.; ABREU, M.C. Análise microbiológica e físico-química do leite pasteurizado tipo "C" comercializado em Teresina, PI. São Paulo: **Rev. Hig. Alimentar**. v. 17, n.111, p. 92-94, ago, 2003.

OLSVIK, O. & STROCBINE, N.A. PCR detection of heat-stabile, heat-labile and shiga like toxin genes in *E. coli*. In: PERSING, D.H.; SMITH, T.H.; TENOVER, F.; WHITE, T.J. (eds) **Diagnostic molecular microbiology: principles and applications**. Washington, D.C. American Society for microbiology, p.271-276, 1993.

PANETO, B.R.; SCHOCKEN-ITURRINO, R.P.; MACEDO, C.; SANTO, E.; MARIN, J.M. Ocorrência de *Escherichia coli* toxigênica em queijo de Minas Frescal no Brazil. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec**. V.59, n.2, Belo Horizonte, p.508-512, apr, 2007.

PEREIRA, A.de.A.; CARDOSO, M.das.G.; ABREU, I.R.de; MORAIS, A.R.de; GUIMARÃES, L.G.de.L.; SALGADO, A.P.S.P. Caracterização química e efeito inibitório de óleos essenciais sobre o crescimento de *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*. **Ciênc. Agrotec**. v. 32, n.3, p. 887-893. Lavras, mai/jun., 2008.

PEREIRA, M.L.; CARMO, L.S.; COLEN, G. Avaliação das condições higiênico-sanitárias de queijos comercializados no município de Belo Horizonte, MG.1987. In:

ENCONTRO NACIONAL DE ANALISTAS DE ALIMENTOS, 3, Florianópolis, 1987. **Anais...** Florianópolis, sp., 1987.

PEREIRA, M.L.; GASTELO, M.C.A.; BASTOS, E.M.A.F.; CAIAFFA, W.T.; FALEIRO, E.S.C. Avaliação de ensaios analíticos para detecção de coliformes fecais em queijo Minas **Arq. Bras. Med. Zootec.** v.51, n.5, Belo Horizonte, p.421-426, out., 1999.

PORTE, A. & GODOY, R.L.de O. Alecrim (*Rosmarinus officinalis L.*): propriedades antimicrobianas e químicas do óleo essencial. Curitiba: **B.CEPPA**, v. 19, n.2, p. 193 - 210, jul./dez, 2001.

QUEIROGA, R.de.C.R.do.E.; GUERRA, I.C.D.; OLIVEIRA, C.E.V.de; OLIVEIRA, M.E.G.de; SOUZA, E.L.de. Elaboração e caracterização físico-química, microbiológica e sensorial de queijo "tipo Minas Frescal" de leite de cabra condimentado. **Rev. Ciênc. Agron.**, Fortaleza, v. 40, n.3, p. 363-372, 2009.

QUINTANA, R.C. & CARNEIRO, L.C. Avaliação das condições higiênico-sanitárias do queijo Minas Frescal e mussarela produzidos na cidade de Morrinhos, GO. **Rev. Bras. Saúde. Prod. An. Local**, v.8, n.3, p.205-211, jul./set., 2007.

QUINTO, E.J. & CEPEDA, A. Incidence of toxigenic *Escherichia coli* in soft cheese made with raw or pasteurized milk. **Lett. in Appl. Microbiol.**, v.24, p.291-295, 1997.

RANGEL, P.M. & MARIN, J.M. Resistência a agentes antimicrobianos em cepas brasileiras de *Escherichia coli* codificadora de shiga toxina isolada de vaca com mastite. Jaboticabal: **Ars Veterinária**, v.25, n.1, p.18-23, 2009.

RAPINI, L.S.; TEIXEIRA, J.P.; MARTINS, S.N.E.; CERQUEIRA, M.M.O.P.; SOUZA, M.R.; PENNA, C.F.A.M. Perfil de resistência antimicrobiana de cepas de *Staphylococcus* sp. isoladas de queijo tipo coalho. **Arq. Bras. Méd. Vet. Zootec.** Belo Horizonte. v, 56, n.1, p. 130-133, 2004.

RIBEIRO, M.G.; GERALDO, J.S.; LANGONI, H.; LARA, G.H.B.; SIQUEIRA, A.K.; SALERNO, T.; FERMANDNES, M.C. Microrganismos patogênicos celularidade e resíduos de antimicrobianos no leite bovino produzido no sistema orgânico. **Pesq. Vet. Bras.**, v. 29, n.1, Rio de Janeiro, jan, p.52-58, 2009.

RIBEIRO, M.G.; COSTA, E.O.; LEITE, D.S.; LANGONI, H.; GARINO JUNIOR, F.; VITÓRIA, C.; LISTONI, F.J.P. Fatores de virulência em linhagens de *Escherichia coli* isoladas de mastite bovina. **Arq. Bras. Méd. Vet. Zootec.** Belo Horizonte v.58, n.5, p.724 -731., out, 2006.

RIVERA, I.G.; CHOWDHURY, M.A.R., HUQ, A., JACOBS, D., MARTIUS, M.T. & COLWELLI, R.R. 1995. Enterobacterial repetitive intergenic consensus sequences and

the PCR to generate fingerprints of genomic DNAs from *Vibrio cholerae* O1, O139 and non-O1 strains. **Appl. Environ. Microbiol.** v.61. p. 2898-2904.

ROCHA, J.S.; BURITI, F.C.A.; SAAD, S.M.I. Condições de processamento e comercialização de queijo – de – Minas Frescal. **Arq. Bras. Méd. Vet. Zootec.** v. 58, n.2. Belo Horizonte, p.236-272, apr. 2006.

RODRIGUES, F.T.; VIEIRA, M.D.; SANTOS, J.L. Características microbiológicas do queijo minas frescal. **Rev. Hig. Alimentar**, v. 12, p.24-27, 1995.

ROSA, V.P.da.; PORTO, E.; SPOTO, M.H.F. Avaliação microbiológica e sensorial de queijos Minas frescal embalados sob atmosfera modificada. **Rev. Hig. Alimentar**, v. 19, n.132, p. 58-64, jun. 2005.

ROSSI, F. & ANDREAZZI, D.B.R. **Resistência bacteriana: Interpretando o antibiograma.** São Paulo: Editora Atheneu, 2005. 118p.

RUSSO, T.A. & JOHNSON, J.R. A proposal for an inclusive designation for extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*: ExPEC. **J. Infect. Dis.** N.181, p.1753-1754, 2000.

SABIONI, J.G. & PINHEIRO, R.M. Ocorrência de microrganismos patogênicos em queijos Minas-frescal, comercializados na Região de Ouro Preto, MG. **Rev. Hig. Alimentar**, v. 22, n.166, p. 117-120, nov/dez., 2008.

SAGDIÇ. O. Sensivity of four pathogenic bacteria to Turkish thyme and oregano hydrosols. **Libensm, Wiss u-Technolol.** V.36, p. 467-473, 2003.

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

SANTO, E. Detecção de *Escherichia coli* patogênica extraintestinal e análise de seus fatores de virulência e perfil de resistência antimicrobiana em carne moída de açougues do município de Taquaritinga, SP, Brasil. Jaboticabal: UNESP, 2006. 118p. Tese – Programa de Pós Graduação em Microbiologia Agropecuária, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinária. Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2006.

SANTOS, A.C.de.M.; PIGNATARI, A.C.C.; SILVA, R.M.; ZIDKO, A.C.M.; GALES, A.C. a VIRULÊNCIA DE *Escherichia coli* patogênica extra-intestinal (ExPEC) em relação à idade e ao sexo do hospedeiro. **O mundo da Saúde**, n.33, n.4, p.392-400, 2009.

SAPATA, F.F.; RUSSO, L.G.; ABREU, T.Q.de.; SILVA, W.A.da.; GONÇALVES, F.B. Ocorrência de *Staphylococcus coagulase* positiva, coliformes totais, coliformes a 45° C

e *Escherichia coli*, em queijo Minas Frescal. São Paulo: **Rev. Hig. Alimentar.** v. 22, n. 165, p. 75-81. out, 2008.

SEYDIM, A.C. & SARIKUS, G. Antimicrobial activity of whey protein based edible films incorporated with oregano, rosemary and garlic essential oils. **Food Reser. Internation.** n 39, p. 639-644, 2006.

SILVA, N.da; JUNQUEIRA, V.C.A.; SILVEIRA, N.F.A.; TANIWAKI, M.H.; SANTOS, R.F.S.dos; GOMES, R.A.R. **Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos.** 3 ed. São Paulo: Livraria Varela, 2007. 552p.

SILVA, J.A. & SILVA, D.da. *Escherichia coli* Enteropatogênica (EPEC), ao contrário da *Echerichia coli* comensal, adere, sinaliza e lesa enterócitos. **Rev. Patol. Trop.** v.34, n.3, p.175-196, set/dez, 2005.

SILVA, M.P.; CAVALLI, D.R.; OLIVEIRA, T.C.R.M. Avaliação do padrão de coliformes a 45° C e comparação da eficiência das técnicas dos tubos múltiplos e Petrifilm EC na detecção de coliformes totais e *Escherichia coli* em alimentos. **Ciênc. Tecnol. Aliment.** v. 26, n.2. Campinas p. 352-359. abr./jun, 2006.

SILVA, P. **Farmacologia.** 5 ed. Rio de Janeiro:Guanabara Koogan, 1998. 1.314p.

SILVA, Z.N.da.; CUNHA, A.S.da.; LINS, M.C.; CARNEIRO, L.de.A.M.; ALMEIDA, A.C.de.F.S.; QUEIROZ, M.L.P. Isolamento e identificação sorológica de *Escherichia coli* enteropatogênica em leite pasteurizado. **Rev. Saúd. Públic.** São Paulo, v.35, n.4, p. 375-379, 2001.

SIMMONS, N.A. Global views on *Escherichia coli* O157:H7 and other verocytotoxic. *E. coli* spp: UK views. **J. Food Protec.** V.60, p.1463-1465, 1997.

SOUZA, C.A.S.de.; AVANCINI, C.A.M.; WIEST, J.M. Atividade antimicrobiana de *Tagetes minuta* L - *Compositae* (*Chincilho*) frente a bactérias Gram- positivas e Gram-negativas. **Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.** São Paulo, v.37, n.6, dez. 2000.

SOUZA, E.L.de.; STAMFORD, T.L.M.; LIMA, E.de.O.; TRAJANO, V.N; BARBOSA FILHO, J.M. Antimicrobial effectiveness of spices: in Approach for Use in food conservaton systems. **Brazil. Arch. Biol. Technol.** v. 48, n.4, p. 549-558, jul. 2005a.

SOUZA, E.L.de.; STAMFORD, T.L.M.; LIMA, E.de.O.; TRAJANO, V.N; BARBOSA FILHO, J.M. Orégano (*Origanum vulgare* L., *Lamiaceae*): uma especiaria como potencial fonte de compostos antimicrobianos. São Paulo: **Rev. Hig. Alimentar.** v.19, n.132, p.40-45, 2005b.

SOUZA, J.M.; SILVA, M.C.C.; MARTINS VIEIRA, M.B.C. Avaliação da qualidade microbiológica de queijos comercializados em Belo Horizonte, MG, no período de 1984



a 1991. In: ENCONTRO NACIONAL DE ANALISTAS DE ALIMENTOS. Porto Alegre, 1993. **Anais....** Porto Alegre, p. 79.

SOUZA, S.M.C.de.; PAREIRA, M.C.; ANGÉLICO, C.L.; PIMENTA, C.J. Avaliação de óleos essenciais de condimentos sobre o desenvolvimento micelial de fungos associados a produtos de panificação. **Ciênc. Agrotec.** Lavras, v.28, n.3, p. 685-690, mai./jun, 2004.

SMITH, J.L. FRATAMICO, P.M.; GUNTHER, N.W. Extraintestinal Pathogenic *Escherichia coli*. **Foodborne Pathog. Dis.** n.4, v.2, p.134-163, 2007.

STELLA, A.E.; RIGOBELLO, E.C.; OLIVEIRA, A.C.de; MALUTA, R.P.; MARIN, J.M. e ÁVILA, F.A.de. Ocorrência e sensibilidade microbiana de linhagens de *Escherichia coli* enteropatogênicas isoladas de propriedades leiteiras na região de Ribeirão Preto, SP, Brasil. **Vet. e Zootec.**, v. 15, n.1, abr.; p.66-74, 2008.

TAVARES, W. **Manual de quimioterápicos antinfeciosos.** Rio de Janeiro: Atheneu, 1990, 770p.

TEBALDI, V.M.R.; OLIVEIRA, T.L.C.de.; RAMALHO, G.C.deA.; PICOOLI, R.H. Bactérias da família *Enterobacteriaceae* isoladas durante a vida de prateleira de ricota. **Rev. Hig. Alimentar.** v. 22, n. 165, p. 100-104. Out., 2008.

TERAMOTO, J.R.S.; FABRI, E.G.; PANTANO, A.P. MINAMI, K.; SUGIO, P.A.; PACHECO, S.G.A. **Produção de orégano: do plantio à comercialização.** Campinas: Instituto Agrônomo, 2009, 19p.

TOWNSEND, G.C.; SCHELD, W.M. Tratamento antimicrobiano. In: VERONESSI R.; FOCACCIA, R. (eds). **Tratado de Infectologia.** Ed. Atheneu, São Paulo, 1996, p.48-79.

TRABULSI, L.R.; ALTERTHUM, F.; GOMPERTZ, O.F.; CANDEIAS, J.A.N. **Microbiologia** 4ª ed. São Paulo: Editora Atheneu, 2005, 718p.

TRAJANO, V.N.; LIMA, E.deO.; SOUZA, E.L.de; TRAVASSOS, A.E.R. Propriedades antibacteriana de óleos essenciais de especiarias sobre bactérias contaminantes de alimentos. **Ciênc. Technol. Aliment.** v.29, n.3. p. 542-545 Campinas, July/sept., 2009.

VALENTE, A.M.; KASNOWSKI, M.C.; FRANCO, R.M.; MESQUITA, E.de F.M.de; OLIVEIRA, L.A.T.de.; CARVALHO, J.C.A.do.P.; FREITAS, M.Q.de e JESUS, E.F.O.de. Mexilhões irradiados: análise sensrial e estudo da sensibilidade antimicrobiana de cepas de *Escherichia coli* e *Enterococcus*. **Rev. Hig. Alimentar.** v.22, n.162, p.88-95, jun, 2008.

VANDERZANT, C. & SPLITTSTOESSER, D.F. **Compendium for the microbiological examination of foods**. 3ed. Washington: American Public Health Association, 1992, 1219p.

VICENTE, H.I.G.; AMARAL, L.A.de.; CERQUEIRA, A.de.M.F. Shigatoxigenic *E. coli* serogroups O157, O111 e O113 in feces, water and milk samples from dairy farms. **Braz. J. Microbiol.** v. 36, n.3, São Paulo, p.217-222. jul./set, 2005.

VIEIRA, R.H.S.dos.F.; ATAYDE, M.A.; CARVALHO, E.M.Rde.; CARVALHO, F.C.T.de; FONTEKES FILHO, A.A. Contaminação fecal da ostra *Crassostrea rhizophorae* e da água de cultivo do estuário do Rio Pacoti (Eusébio, Estado do Ceará): isolamento e identificação de *Escherichia coli* e sua susceptibilidade a diferentes antimicrobianos. **Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.**, São Paulo, v.45, n.3, p.180-189, 2008.

YANO, Y.; SATOMI, M.; OKAWA, H. Antimicrobial effect of spices and herbs on *Vibrio parahaemolyticus*l. **Internat. J. Food Microbiol.** V.11,p.6-11, 2006.

ZHANG, H.; CHEN, F.; WANG, X.; YAO, H. Evaluation of antioxidant activity of parsley (*Petroselinum crispum*) essential oil and identification of its antioxidant constituents. **Food Resear. Internation.**, v.39, p.833-839, 2006.

**APÊNDICES**

**APÊNDICE 1**

**Apêndice 1.** Mapa do Triângulo Mineiro.  
Fonte: [www.minasgerais.net](http://www.minasgerais.net), 2009.

## APÊNDICE 2

### PREPARAÇÃO DE MEIO DE CULTURA

#### A) Lauril Sulfato Triptose (LST) (OXOID CM 451)

Introdução: Recomendado pela APHA para a detecção de coliformes em água, derivados de leite e outros alimentos usando técnica de NMP.

Fórmula:	g/Litro
Cloreto de sódio	5,0
Fosfato bibásico de potássio	2,75
Fosfato monobásico de potássio	2,75
Lactose	5,0
Lauril sulfato de sódio	0,1
Peptona de caseína	20,0
pH final: $6,8 \pm 0,2$ a $25^{\circ} \text{C}$	

Preparação: Dissolver 35,6g em um litro de água destilada. Aquecer ligeiramente, se necessário. Distribuir em tubos contendo tubos de Durham, de acordo com a quantidade de inóculo. Esterilizar a  $121^{\circ} \text{C}$  por 15 minutos. Não abrir a autoclave antes de a temperatura atingir  $75^{\circ} \text{C}$  para evitar a entrada de bolhas de ar nos tubos de Durham.

Reação: Positiva = turvamento do meio com produção de gás; Negativa = sem produção de gás.

**Reação negativa**  
(meio límpido sem  
produção de gás)



**Reação positiva**  
(meio turvo com  
produção de gás)

## B) Brilliant-Green Bile (2%) Broth (VB) (OXOID CM 31)

Introdução: Meio de cultura seletivo recomendado pela APHA para pesquisar coliformes em águas potáveis, de esgoto, leite, produtos lácteos e outros de importância sanitária.

Fórmula:	g/Litro
Bile bovina	20,0
Lactose	10,0
Peptona de gelatina	10,0
Verde Brilhante	0,0133
Ph final:	7,2 ± 0,2 a 25° C

Preparação: Dissolver 40g em um litro de água destilada. Aquecer ligeiramente, se necessário. Distribuir em tubos contendo tubos de Durham, de acordo com a quantidade de inoculo. Esterilizar a 121° C por 15 minutos. Não abrir a autoclave antes de a temperatura atingir 75° C para evitar a entrada de bolhas de ar nos tubos de Durham.

Reação: Positiva = turvamento do meio com produção de gás; Negativa = sem produção de gás.

**Reação negativa**  
(meio límpido, sem  
produção de gás)



**Reação positiva**  
(meio turvo com produção de

### C) EC Broth (EC) (MERCK 10765)

Introdução: Meio de cultura seletivo recomendado pela APHA para detecção e contagem do Número Mais Provável (NMP) de coliformes fecais em águas, esgotos e alimentos.

Fórmula:	g/Litro
Cloreto de sódio	5,0
Fosfato bibásico de potássio	4,0
Fosfato monobásico de potássio	1,5
Lactose	5,0
Peptona de caseína	20,0
Sais biliares nº3	1,5
pH final: $76,9 \pm 0,2$ a $25^{\circ} \text{C}$	

Preparação: Dissolver 37g em um litro de água destilada. Aquecer ligeiramente, se necessário. Distribuir em tubos contendo tubos de Durham, de acordo com a quantidade de inoculo. Esterilizar a  $121^{\circ} \text{C}$  por 15 minutos. Não abrir a autoclave antes de a temperatura atingir  $75^{\circ} \text{C}$  para evitar a entrada de bolhas de ar nos tubos de Durham.

Reação: Positiva = turvamento do meio com produção de gás; Negativa = sem produção de gás.

**Reação negativa**  
(meio límpido, sem  
produção de gás)



**Reação positiva**  
(meio turvo com produção  
de gás)

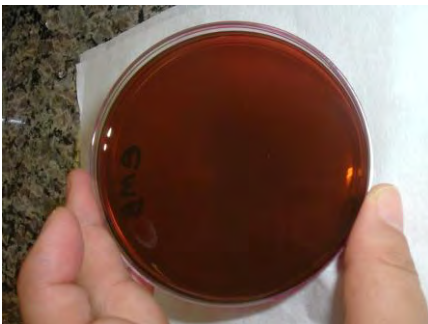
**D) Eosin Metilylene Blue Lactose (MERCK 1347)**

Introdução: Este meio é usada para o isolamento e diferenciação de enterobactérias.

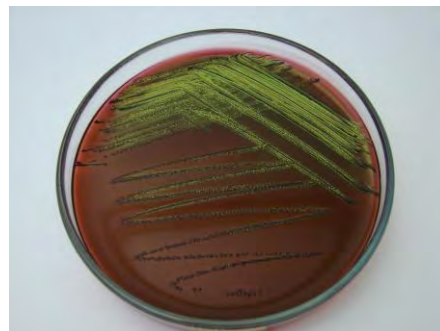
Fórmula:	g/Litro
Peptona de gelatina	10,0
Lactose	5,0
Sacarose	5,0
Fosfato dipotássico	2,0
Eosina Y	0,4
Azul de metileno	0,065
Agar	13,5
pH final: 7,2 ± 0,2 a 25° C	

Preparação: Dissolver 36 g em um litro de água destilada. Hidratar por 10 a 15 minutos. Aquecer agitando frequentemente e ferver por um minuto. Esterilizar a 121° C por 15 minutos. Esfriar até 45 – 50° C. Distribuir, agitando suave e frequentemente, 15 – 20 ml por placa de Petri estéril, evitando formação de bolhas.

Reação: Positiva para *E. coli* – colônias azuis negras com centro negro e bordas claras à luz transmitidas, brilho metálico esverdeado à luz refletida. Negativa para *E. coli* - coloração marrom acinzentadas no centro, geralmente sem brilho metálico e com tendência a se unirem ou transparentes.



**Reação negativa**



**Reação positiva**



### E) Simmons Citrate Agar (MERCK 2501)

Introdução: Usado para diferenciar e identificar Enterobactérias, baseando-se na utilização do citrato como única fonte de carbono. Neste processo as bactérias que metabolizam o substrato citrato pelo ciclo de Krebs (oxidação) ou pelo ciclo de fermentação, resulta como produto final pH alcalino, acetato+ formato.

Fórmula:	g/Litro
Fosfato monobásico de amônio	1,0
Fosfato dipotássico	1,0
Cloreto de sódio	5,0
Citrato de sódio	2,0
Sulfato de magnésio	0,2
Azul de bromotimol	0,08
Agar	15,0
pH final: $6,9 \pm 0,2$ a $25^{\circ} \text{C}$	

Preparação: Dissolver 24,2g em um litro de água destilada. Hidratar por 10 a 15 minutos. Aquecer agitando frequentemente e ferver por um minuto. Distribuir 5 ml por tubo. Esterilizar a  $121^{\circ} \text{C}$  por 15 minutos. Esfriar em posição inclinada.

Reação: Positiva = Azul com crescimento (A bactéria é capaz de usar citrato como uma única fonte de carbono e utiliza sais de amônia como sua fonte única de nitrogênio, assim os sais de amônia se desdobram em amoníaco com conseqüente alcalinidade – coloração azul); Negativa = verde sem crescimento, pois a bactéria não consegue utilizar a fonte de carbono e nitrogênio do meio, não sobrevivendo.

**Reação negativa**  
(Verde sem crescimento)



**Reação positiva**  
(Azul com crescimento)



### F) Tríplice Sugar Iron Agar (TSI MERCK 3915)

Introdução: Meio diferencial recomendado para a identificação de bacilos entéricos, baseado na fermentação da glicose, lactose e sacarose e na produção de sulfeto de hidrogênio (H<sub>2</sub>S).

Fórmula:	g/Litro
Agar bacteriológico	13,0
Cloreto de Sódio	5,0
Dextrose	1,0
Lactose	10,0
Peptona de carne	10,0
Peptona de caseína	10,0
Sacarose	10,0
Sulfato ferro III e amônio	0,2
Tiosulfato de sódio	0,2
Vermelho de fenol	0,025
pH final: 7,3 ± 0,2 a 25° C	

Preparação: Dissolver 59,4 g em um litro de água destilada. Hidratar por 10 a 15 minutos. Aquecer agitando frequentemente e ferver por 1 minuto. Distribuir 3 ml por tubo. Esterilizar a 121° C por 15 minutos. Esfriar em posição inclinada, de modo que o meio no fundo do tubo alcance uma profundidade de 1,5 a 2,0 cm.

Reação: Positiva para *E. coli* – Fundo ácido/Rampa ácida. Negativa para *E. coli* – Fundo alcalino/rampa alcalina, produção de H<sub>2</sub>S.



**Reação negativa**



**Reação positiva**  
(Fundo ácido/Rampa ácida/com produção de gás)



**Reação positiva**  
(Fundo ácido/Rampa alcalina/com produção de H<sub>2</sub>S)



**Reação positiva**  
(Fundo ácido/Rampa alcalina/sem produção de H<sub>2</sub>S)

### G) SIM Medium (SIM)(MERCK 5470).

Introdução: Usado rotineiramente na diferenciação de culturas puras de enterobactérias para determinação da produção de sulfetos, indol e motilidade. Determina a habilidade de um determinado microrganismo em produzir o indol a partir da molécula de triptofano.

Fórmula:	g/Litro
Agar bacteriológico	3,5
Peptona de carne	6,1
Peptona de caseína	20,0
Sulfato ferro III e amônio	0,2
Tiosulfato de sódio	0,2
pH final: 7,3 ± 0,2 a 25 C	

Preparação: Dissolver 30 g em um litro de água destilada. Hidratar por 10 a 15 minutos. Aquecer agitando frequentemente e ferver por 1 minuto. Distribuir 3 ml por tubo. Esterilizar a 121 C por 15 minutos.

Reação: Positiva para *E. coli* – Indol positivo (A bactéria degrada o triptofano produzindo indol, escatol e ácido indolacético. O reativo de Kovacs, se liga  molécula do indol produzindo um composto quinoidal de coloração vermelha).



**Reação negativa**  
(sem crescimento)



**Reação positiva**  
(crescimento com motilidade, sem produção de H<sub>2</sub>S)



**Reação positiva**  
(crescimento com motilidade, com produção de H<sub>2</sub>S,



**Reação positiva**  
(indol positivo)



**Reação positiva**  
(Indol negativo)

## H) Methyl – Red Voges-Proskauer Broth (MR-VP) (MERCK 5712)

Introdução: O meio é indicado para a diferenciação de bactérias através das reações do vermelho de metila e acetil-metil-cabinol (Voges-Proskauer). É recomendado para a diferenciação de organismos coliformes de acordo com os Métodos Padrões para o Exame de Produtos derivados de Leite e águas.

- No teste VP será pesquisada a fermentação butilenoglicol, na qual as bactérias utilizam a glicose como substrato e liberam acetoína como principal produto final.

Fórmula:	g/Litro
Dextrose	5,0
Fosfato bibásico de potássio	5,0
Peptona de carne	3,5
Peptona de caseína	3,5
pH final: 6,9 ± 0,2 a 25° C	

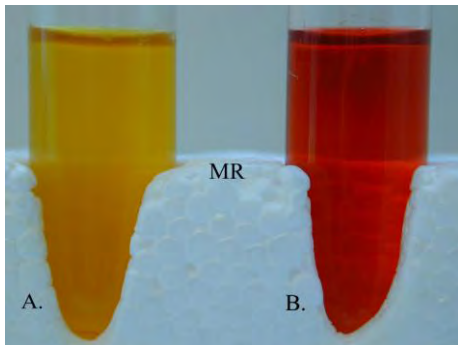
Preparação: Dissolver 17,0 g em um litro de água destilada. Aquecer ligeiramente, se necessário. Esterilizar a 121° C por 15 minutos.

### Reação:

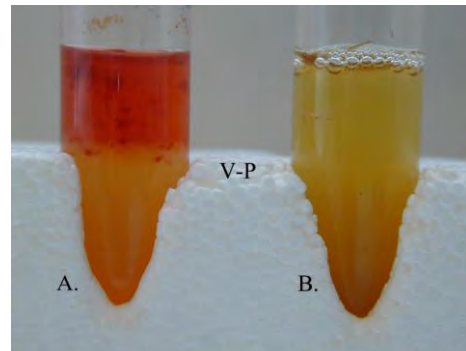
Prova do Vermelho de Metila – A 5ml de cultura de 5 dias, adicionar 5 gotas da solução do indicador. Uma coloração vermelha indica reação positiva (Os microrganismos VM positivo fermentam a glicose produzindo ácidos e dando um pH final muito baixo, vencendo o sistema tampão de fosfato e mantendo o meio ácido). Uma reação negativa é indicada pela cor amarela (Os microrganismos VM negativo produzem ácidos, porém o pH é mais elevado (pH = 6,0) porque eles continuam metabolizando os produtos iniciais da fermentação por descarboxilação, produzindo acetoína). *E. coli* é VM positiva.

Prova de Voges-Proskauer (Segundo Barrit) – A 1ml da cultura de 24 a 48 horas, adicionar 0,6 ml de solução de naftol em álcool absoluto a 5% e, a seguir, 0,2 ml de solução de KOH a 40% (A acetoína produzida pelas bactérias acrescido de naftol e

KOH convertem em diacetila mais arginina produz o composto vermelho). Agitar suavemente. O aparecimento, dentro de 15 minutos, de uma coloração vermelha indica uma reação positiva. O desenvolvimento de uma coloração cobre deve ser desprezado. *E. coli* é VP negativa.



- A) Reação negativa** (cor amarela)  
**B) Reação positiva** (cor vermelha)



- A) Reação positiva** (cor vermelha)  
**B) Reação negativa** (cor amarela)

### I) Ágar Base Uréia (CM 53)

Introdução: Ágar base para a preparação do meio de Christensen para a detecção da rápida atividade da uréase de *Proteus* e da lenta atividade dessa enzima de algumas *Enterobacteriaceae*.

Fórmula:	g/Litro
Peptona	1,0
Glicose	1,0
Cloreto de sódio	5,0
Fosfato dissódico	1,2
Fosfato monopotássico	0,8
Vermelho de fenol	0,012
Ágar	15,0
pH final: 6,8 ± 0,2 a 25° C	

Preparação: Dissolver 2,4 g em um 95 mL de água destilada. Aquecer ligeiramente, se necessário. Esterilizar a 115° C por 20 minutos. Resfrie a 50° C e, assepticamente,

adicione 5 mL de uma Solução de Uréia 40% SR20. Misture bem, distribua em alíquotas de 10 mL em tubos estéreis e deixe solidificar de modo inclinado.

Reação: Positiva: coloração rosa escuro significa que a bactéria possui a enzima uréase, que hidrolisa a uréia em amônia, alcalinizando o meio e virando o indicador de pH vermelho-de-fenil de amarelo (pH6,8) para rosa escuro (pH 8,0). Negativo: coloração amarela, com crescimento de microrganismos. Estas bactérias utilizam da peptona no meio.



**Reação negativa**



**Reação positiva**

### **J) Fenilalanina desaminase (MICROMED 2022)**

Introdução: Determina a capacidade de um microrganismo de desaminar a fenilalanina em ácido fenilpirúvico, por sua atividade enzimática, com conseqüente acidez.

Fórmula:	g/Litro
DL – fenilalanina	2,0
Extrato de levedura	3,0
Cloreto de sódio	5,0
Fosfato de sódico	1,0
Ágar	15,0
pH final: 6,8 ± 0,2 a 25° C	

Preparação: Dissolver 26 g em 1.000 ml de água destilada. Aquecer ligeiramente, até que uma suspensão uniforme seja objetiva. Esterilizar a 121° C por 15 minutos. Resfrie

a 50° C e, assepticamente, distribua em alíquotas de 10 mL em tubos estéreis e deixe solidificar de modo inclinado.

Reação: No momento da leitura, adicionar quatro a cinco gotas de cloreto férrico. Rodar suavemente o tubo entre as mãos. Positivo quando há formação de cor verde, houve a desaminação. O  $\text{FeCl}_3$  atua como agente quelante, e o faz com o ácido fenilpirúvico para formar uma cor verde. Negativo quando mantem a coloração amarela, isto quando não houve desaminação, isto é, como não existe o ácido fenilpirúvico, permanece a cor do reativo  $\text{FeCl}_3$  que é amarela.



**Reação negativa**  
(cor amarela)



**Reação positiva**  
(cor verde)

### **K) Meio Luria Bertoni (LB)**

Introdução: Meios comumente utilizados para o crescimento de bactérias e leveduras.

Fórmula:	g/Litro
Triptona	10 g
Extrato de levedura	5 g
NaCl	10 g
pH final: 7,3 ± 0,2 a 25° C	

Preparação: Pesar todos os meios em 1.000 ml de água destilada. O pH foi ajustado para 7,3 com hidróxido de sódio durante 20 min a um atm de pressão. Autoclavar o meio a 121° C por 15 min e colocar em eppendorf estéril.

### **L) Agar MUELLER HINTON**

Introdução: Meio rico em nutrientes recomendado para a realização de antibiograma (teste de sensibilidade), pela técnica de difusão de discos descrita pelo NCCLS.

Fórmula:	g/Litro
Agar bacteriológico	15,0
Cloreto de sódio	8,0
Extrato de carne	3,0
Peptona de gelatina	5,0
pH final: 7,3 ± 0,2 a 25° C	

Preparação: Dissolver 31g em um litro de água destilada. Hidratar por 10 a 15 minutos. Aquecer agitando frequentemente e ferver por 1 minuto. Esterilizar a 121° C por 15 minutos. Distribuir 25 ml por placa de Petri estéril.

### **M) ÁGAR NUTRIENTE (NUTRIENT BROTH)**

Introdução: Meio de uso geral em laboratório, indicado para cultura de germes pouco exigentes. Pode-se ser usado em bacteriologia sanitária, humana e industrial.

Fórmula:	g/Litro
Agar bacteriológico	17,0
Amido de batata	1,5
Extrato de carne	2,0
Hidrolisado ácido de caseína	17,5
pH final: 7,4 ± 0,2 a 25° C	



Preparação: Dissolver 38 g em um litro de água destilada. Hidratar por 10 a 15 minutos. Aquecer agitando frequentemente e ferver por 1 minuto. Esterilizar a 121° C por 15 minutos. Distribuir 25 ml por placa de Petri estéril.

### **N) CALDO INFUSO CÉREBRO CORAÇÃO (BHI) (BRAIN HEART INFUSION)**

Introdução: Meio muito rico em nutrientes e especialmente útil para a cultura e desenvolvimento de germes delicados e difíceis.

Fórmula:	g/Litro
Cloreto de sódio	5,0
Dextrose	2,0
Fosfato bi-básico de sódio	2,0
Infuso de cérebro e coração	17,5
Peptona de carne	5,0
Peptona de caseína	5,0
pH final: 7,4 ± 0,2 a 25° C	

Preparação: Dissolver 37 g em um litro de água destilada. Distribuir 5 ml por tubo 15x125 mm. Esterilizar a 121° C por 15 minutos.

### **O) Solução Tampão TAE**

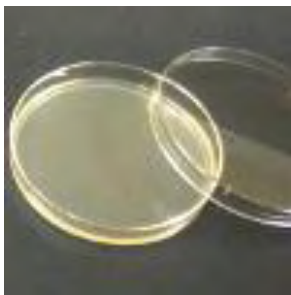
<b>Solução trabalho</b>	<b>Solução estoque (1L)</b>
1x: 0,04M Tris-acetato	50 x: 242 g Tris base
0,0001 M EDTA	57,1 mL de ácido acético glacial
	100 mL 0,5M EDTA
pH = 8,0.	

## P) CHROMOCULT AGAR

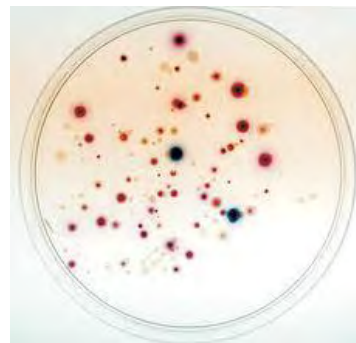
Introdução: Meio cromogênico para auxiliar na diferenciação entre *Escherichia coli* e outros coliformes em culturas provenientes de alimentos e amostras ambientais.

Fórmula:	g/Litro
Peptona	3,0
Cloreto de sódio	5,0
Fosfato monopotássico	2,2
Fosfato disódico	2,7
Triptona	1,0
Sódio piruvato	1,0
Vermelho neutro	0,15
Sorbitol	1,0
Mistura cromogênica	0,4
Agar	10,0
pH final: $7,8 \pm 0,2$ a $25^{\circ} \text{C}$	

Preparação: Dissolver 26,5 g em um litro de água destilada. O meio deve ser fervido em corrente vapor de d'água com agitação regular até que o meio de cultura seja dissolvido completamente. Não deve tratar em autoclave. Esfriar o meio a  $45^{\circ} - 50^{\circ} \text{C}$  e verter em placas.



**Meio estéril**, sem contaminação



**Meio contaminado**

(cor vermelha – coliformes a  $35^{\circ} \text{C}$ ;  
Cor roxa (azul) – coliformes a  $45^{\circ} \text{C} = E. coli$ )

### APÊNDICE 3

**Apêndice 3a.** Contagem de Coliformes a 35° C e Coliformes a 45° C em Números Mais Provável (NMP) no **Queijo com SIF** (Produzidos com leite pasteurizado, alimento inspecionado) coletadas na região do Triângulo Mineiro.

Amostra	Local	Coliformes a 35° C	Coliformes a 45° C
1	Uberlândia	9,2	3,6
2	Uberlândia	9,2	<3,0
3	Patos de Minas	>1,1x10 <sup>3</sup>	7,4
4	Uberaba	>1,1x10 <sup>3</sup>	<3,0
5	Uberaba	>1,1x10 <sup>3</sup>	>1,1x10 <sup>3</sup>
6	Uberaba	<3,0	<3,0
7	Uberaba	<3,0	<3,0
8	Uberaba	<3,0	<3,0
9	Uberlândia	>1,1x10 <sup>3</sup>	>1,1x10 <sup>3</sup>
10	Uberaba	3,6	<3,0
11	Uberaba	>1,1x10 <sup>3</sup>	1,1x10 <sup>3</sup>
12	Uberaba	>1,1x10 <sup>3</sup>	>1,1x10 <sup>3</sup>
13	Araxá	>1,1x10 <sup>3</sup>	1,1x10 <sup>3</sup>
14	Uberaba	>1,1x10 <sup>3</sup>	>1,1x10 <sup>3</sup>
15	Uberaba	>1,1x10 <sup>3</sup>	>1,1x10 <sup>3</sup>
16	Uberaba	>1,1x10 <sup>3</sup>	>1,1x10 <sup>3</sup>
17	Sacramento	1,1x10 <sup>3</sup>	7,5x10
18	Uberaba	>1,1x10 <sup>3</sup>	>1,1x10 <sup>3</sup>
19	Uberaba	>1,1x10 <sup>3</sup>	4,6x10 <sup>2</sup>
20	Uberlândia	>1,1x10 <sup>3</sup>	>1,1x10 <sup>3</sup>
21	Uberaba	3,6	<3,0
22	Uberlândia	4,6x10 <sup>2</sup>	<3,0
23	Uberlândia	<3,0	<3,0
24	Uberlândia	>1,1x10 <sup>3</sup>	9,2
25	Uberlândia	4,3x10	4,3x10
26	Uberlândia	>1,1x10 <sup>3</sup>	<3,0
27	Uberlândia	<3,0	<3,0
28	Uberlândia	9,2	3,6
29	Uberaba	<3,0	<3,0
30	Uberaba	2,4x10 <sup>2</sup>	2,4x10 <sup>2</sup>
Padrão	vigente		5x10 <sup>2</sup>

**Apêndice 3b.** Contagem de Coliformes a 35° C e Coliformes a 45° C em Número Mais Provável (NMP) no **Queijo sem SIF** (Produzidos com leite cru – não pasteurizado, sem inspeção) coletadas na região do Triângulo Mineiro.

<b>Amostra</b>	<b>Local</b>	<b>Coliformes a 35° C</b>	<b>Coliformes a 45° C</b>
1	Uberlândia	$>1,1 \times 10^3$	$>1,1 \times 10^3$
2	Uberaba	$>1,1 \times 10^3$	$4,6 \times 10^2$
3	Uberaba	$>1,1 \times 10^3$	$>1,1 \times 10^3$
4	Uberlândia	$1,1 \times 10^3$	$1,1 \times 10^3$
5	Uberaba	$>1,1 \times 10^3$	$>1,1 \times 10^3$
6	Uberaba	$>1,1 \times 10^3$	$>1,1 \times 10^3$
7	Frutal	$>1,1 \times 10^3$	$>1,1 \times 10^3$
8	Uberlândia	$>1,1 \times 10^3$	$>1,1 \times 10^3$
9	Uberlândia	$>1,1 \times 10^3$	$1,1 \times 10^3$
10	Uberaba	$>1,1 \times 10^3$	$>1,1 \times 10^3$
11	Uberaba	$>1,1 \times 10^3$	$2,4 \times 10^2$
12	Uberlândia	$>1,1 \times 10^3$	$>1,1 \times 10^3$
13	Uberlândia	$>1,1 \times 10^3$	$>1,1 \times 10^3$
14	Uberlândia	$>1,1 \times 10^3$	$1,1 \times 10^3$
15	Campo Florido	$>1,1 \times 10^3$	$>1,1 \times 10^3$
16	Campo Florido	$>1,1 \times 10^3$	$>1,1 \times 10^3$
17	Campo Florido	$>1,1 \times 10^3$	$1,1 \times 10^3$
18	Uberaba	$>1,1 \times 10^3$	$>1,1 \times 10^3$
19	Uberaba	$>1,1 \times 10^3$	$>1,1 \times 10^3$
20	Uberaba	$1,5 \times 10^2$	$9,3 \times 10^2$
21	Uberaba	$>1,1 \times 10^3$	$>1,1 \times 10^3$
22	Uberaba	$>1,1 \times 10^3$	7,4
23	Uberaba	$>1,1 \times 10^3$	$>1,1 \times 10^3$
24	Uberaba	$>1,1 \times 10^3$	$>1,1 \times 10^3$
25	Uberaba	$1,1 \times 10^3$	9,2
26	Nova Ponte	$>1,1 \times 10^3$	$4,6 \times 10^2$
27	Nova Ponte	$>1,1 \times 10^3$	$1,1 \times 10^3$
28	Nova Ponte	$>1,1 \times 10^3$	$>1,1 \times 10^3$
29	Nova Ponte	$1,1 \times 10^3$	$1,1 \times 10^3$
30	Nova Ponte	$>1,1 \times 10^3$	$>1,1 \times 10^3$
31	Uberaba	$>1,1 \times 10^3$	$>1,1 \times 10^3$
32	Uberlândia	$>1,1 \times 10^3$	$2,4 \times 10^2$
33	Uberlândia	$>1,1 \times 10^3$	$>1,1 \times 10^3$
34	Uberlândia	$>1,1 \times 10^3$	$4,6 \times 10^2$
35	Uberaba	$>1,1 \times 10^3$	$4,3 \times 10^2$
36	Uberaba	$>1,1 \times 10^3$	$2,3 \times 10^2$
37	Uberaba	$>1,1 \times 10^3$	$4,3 \times 10^2$
38	Uberlândia	$>1,1 \times 10^3$	$1,1 \times 10^3$
39	Uberlândia	$>1,1 \times 10^3$	$>1,1 \times 10^3$
40	Uberaba	$>1,1 \times 10^3$	$>1,1 \times 10^3$

41	Uberlândia	$>1,1 \times 10^3$	$4,6 \times 10^2$
42	Uberlândia	$>1,1 \times 10^3$	$>1,1 \times 10^3$
43	Uberaba	$>1,1 \times 10^3$	$>1,1 \times 10^3$
44	Uberaba	$>1,1 \times 10^3$	$>1,1 \times 10^3$
45	Uberlândia	$>1,1 \times 10^3$	$1,1 \times 10^3$
46	Uberaba	$>1,1 \times 10^3$	$>1,1 \times 10^3$
47	Uberaba	$>1,1 \times 10^3$	$>1,1 \times 10^3$
48	Uberaba	$1,5 \times 10^2$	$<3,0$
49	Uberaba	$>1,1 \times 10^3$	$1,1 \times 10^3$
50	Araxá	$>1,1 \times 10^3$	3,6
Padrão	vigente		$5 \times 10^2$

---

**Apêndice 3c.** Contagem de Coliformes a 35° C e Coliformes a 45° C em Número Mais Provável (NMP) no **Queijo temperado** (Produzido com leite cru, sem inspeção) com especiarias coletadas na região do Triângulo Mineiro.

<b>Amostras</b>	<b>Local</b>	<b>Coliformes a 35° C</b>	<b>Coliformes a 45° C</b>
1	Frutal	$1,1 \times 10^3$	$1,1 \times 10^3$
2	Uberaba	$>1,1 \times 10^3$	$4,6 \times 10^2$
3	Uberlândia	$>1,1 \times 10^3$	$>1,1 \times 10^3$
4	Uberlândia	$>1,1 \times 10^3$	$1,1 \times 10^3$
5	Uberaba	$>1,1 \times 10^3$	$>1,1 \times 10^3$
6	Uberaba	$>1,1 \times 10^3$	$1,1 \times 10^3$
7	Uberlândia	$>1,1 \times 10^3$	$>1,1 \times 10^3$
8	Uberaba	$>1,1 \times 10^3$	$9,3 \times 10$
9	Uberaba	$>1,1 \times 10^3$	$<3,0$
10	Uberaba	$<3,0$	$<3,0$
11	Uberaba	$>1,1 \times 10^3$	3,6
12	Uberaba	$>1,1 \times 10^3$	3,6
13	Conquista	$4,6 \times 10^2$	$4,6 \times 10^2$
14	Uberaba	$>1,1 \times 10^3$	$4,6 \times 10^2$
15	Uberaba	$<3,0$	$<3,0$
16	Uberaba	$>1,1 \times 10^3$	$>1,1 \times 10^3$
17	Uberaba	$1,1 \times 10^3$	3,6
18	Uberaba	$7,5 \times 10$	$1,5 \times 10$
19	Conquista	$>1,1 \times 10^3$	$2,1 \times 10^2$
20	Uberaba	$4,6 \times 10^2$	$4,6 \times 10^2$
21	Uberaba	$2,4 \times 10^2$	$9,3 \times 10$
22	Frutal	$>1,1 \times 10^3$	$<3,0$
23	Uberaba	$>1,1 \times 10^3$	$>1,1 \times 10^3$
24	Uberaba	$>1,1 \times 10^3$	$2,4 \times 10^2$
25	Araxá	$4,3 \times 10$	$4,3 \times 10$
26	Araxá	$4,3 \times 10$	$4,3 \times 10$
27	Conceição	$>1,1 \times 10^3$	$>1,1 \times 10^3$
28	Prata	$>1,1 \times 10^3$	$>1,1 \times 10^3$
29	Uberaba	$>1,1 \times 10^3$	$>1,1 \times 10^3$
30	Frutal	$>1,1 \times 10^3$	$>1,1 \times 10^3$
31	Araxá	$>1,1 \times 10^3$	$>1,1 \times 10^3$
Padrão	vigente		$10^2$

## APÊNDICE 4

**Apêndice 4a.** Valores das diferenças entre as médias dos coliformes a 35°C, isolados dos queijos tipo Minas Frescal.

<b>Pares de média</b>	<b>Valor absoluto da diferença</b>	<b>d.m.s.</b>
Com SIF e Sem SIF	421,49	382,75
Com SIF e temperado	218,42	416,16
Sem SIF e Temperado	203,06	1.174,83

**Apêndice 4b.** Valores das diferenças entre as médias dos coliformes a 45°C, isolados dos queijos tipo Minas Frescal.

<b>Pares de média</b>	<b>Valor absoluto da diferença</b>	<b>d.m.s.</b>
Com SIF e Sem SIF	41.768,2	201,13
Com SIF e temperado	165,29	516,71
Sem SIF e Temperado	41.602,7	509,32

## APÊNDICE 5

### Apêndice 5a. Resultados do teste de normalidade de *Lilliefors* para coliformes a 35°C.

	<b>G1</b>	<b>G2</b>	<b>G3</b>	<b>G4</b>
Tamanho da amostra	10	10	10	10
Desvio máximo	0,2049	0,2279	0,1551	0,2282
Valor crítico (0,05)	0,2580	0,2580	0,2580	0,2580
Valor crítico (0,01)	0,2940	0,2940	0,2940	0,2940
P(valor)	ns	ns	ns	Ns

Onde: G1= Queijo sem tempero (controle); G2 = Queijo com 1% de orégano; G3 = Queijo com 1% de salsa e G4 = Queijo com 0,5% de orégano + 0,5% de salsa; ns=não significativo.

### Apêndice 5b. Intervalo de confiança de 95% para nove graus de liberdade em todos os grupos para os coliformes a 35°C.

Queijo controle	1,2x10 <sup>5</sup>	<	1,3x10 <sup>5</sup>	<	1,5x10 <sup>5a</sup>
Queijo com 1% de orégano	1,1x10 <sup>5</sup>	<	1,2x10 <sup>5</sup>	<	1,3x10 <sup>5a</sup>
Queijo com 1% de salsa	1,1x10 <sup>5</sup>	<	1,3x10 <sup>5</sup>	<	1,5x10 <sup>5a</sup>
Queijo com 0,5% orégano e 0,5% salsa	1,1x10 <sup>5</sup>	<	1,4x10 <sup>5</sup>	<	1,6x10 <sup>5a</sup>

<sup>a</sup> Letras iguais denotam diferenças não significativas.

### Apêndice 5c. Resultados do teste de normalidade de *Lilliefors* para coliformes a 45°C.

	<b>G1</b>	<b>G2</b>	<b>G3</b>	<b>G4</b>
Tamanho da amostra	10	10	10	10
Desvio máximo	0,2242	0,2375	0,1555	0,2310
Valor crítico (0,05)	0,2580	0,2580	0,2580	0,2580
Valor crítico (0,01)	0,2940	0,2940	0,2940	0,2940
P (valor)	ns	ns	ns	ns

Onde: G1= Queijo sem tempero (controle); G2 = Queijo com 1% de orégano; G3 = Queijo com 1% de salsa e G4 = Queijo com 0,5% de orégano + 0,5% de salsa e ns = não significativo.

### Apêndice 5d. Intervalo de confiança de 95% para os grupos testados para os coliformes a 45° C.

Queijo controle	63,73	<	280,0	<	496,27 <sup>a</sup>
Queijo com 1% de orégano	10,68	<	29,0	<	47,32 <sup>b</sup>
Queijo com 1% de salsa	19,29	<	41,0	<	62,71 <sup>b</sup>
Queijo com 0,5% de orégano e 0,5% de salsa	13,68	<	32,0	<	50,32 <sup>b</sup>

<sup>a, b</sup> Letras diferentes denotam diferenças significativas.



## APÊNDICE 6

**Apêndice 6a.** Resultados do teste de normalidade de *Lilliefors* para os coliformes a 35°C isolados dos grupos de queijos inoculados com *E. coli* (ATCC 25922).

	<b>G1</b>	<b>G2</b>	<b>G3</b>	<b>G4</b>
Tamanho da amostra	10	10	10	10
Desvio máximo	0,2435	0,1133	0,2073	0,2013
Valor crítico (0.05)	0,2480	0,2580	0,2580	0,2580
Valor crítico (0.01)	0,2940	0,2940	0,2940	0,2940
P(valor)	ns	ns	ns	ns

Onde: G1= Queijo sem tempero (controle); G2 = Queijo com 1% de orégano; G3 = Queijo com 1% de salsinha e G4 = Queijo com 0,5% de orégano + 0,5% de salsinha e ns = não significativo.

**Apêndice 6b.** Intervalo de confiança de 95% para os diferentes grupos de queijo inoculados com *E. coli* ATCC 25922 para os coliformes a 35°C.

Queijo controle	$1,8 \times 10^9 \leq$	$2,1 \times 10^9 \leq$	$2,4 \times 10^{9a}$
Queijo com 1% de orégano	$3,9 \times 10^8 \leq$	$6,5 \times 10^8 \leq$	$9,2 \times 10^{8b}$
Queijo com 1% de salsinha	$4,4 \times 10^8 \leq$	$7,8 \times 10^8 \leq$	$1,1 \times 10^{9b}$
Queijo com 0,5% orégano + 0,5% salsinha	$9,2 \times 10^8 \leq$	$1,0 \times 10^9 \leq$	$1,2 \times 10^{9b}$

<sup>a, b</sup> Letras diferentes denotam diferenças significativas.

**Apêndice 6c.** Resultados do teste de normalidade de *Lilliefors* da contagem dos coliformes a 45°C, isolados dos diferentes grupos de queijos inoculados com *E. coli* (ATCC 25922).

	<b>G1</b>	<b>G2</b>	<b>G3</b>	<b>G4</b>
Tamanho da amostra	10	10	10	10
Desvio máximo	0.2283	0.2970	0.1484	0.2080
Valor crítico (0.05)	0.2580	0.2580	0.2580	0.2580
Valor crítico (0.01)	0.2940	0.2940	0.2940	0.2940
p(valor)	ns	<0.01	ns	ns

Onde: G1= Queijo sem tempero (controle); G2 = Queijo com 1% de orégano; G3 = Queijo com 1% de salsinha e G4 = Queijo com 0,5% de orégano + 0,5% de salsinha e ns = não significativo.

**Apêndice 6d.** Intervalo de confiança de 95%, para a contagem dos coliformes a 45°C isolados dos diferentes grupos de queijos inoculados com *E. coli* (ATCC 25922).

Queijo controle	$2,2 \times 10^6$	$\leq$	$7,2 \times 10^6$	$\leq$	$1,2 \times 10^{7ab}$
Queijo com 1% de orégano	$8,5 \times 10^5$	$\leq$	$1,6 \times 10^6$	$\leq$	$2,3 \times 10^{6b}$
Queijo com 1% de salsinha	$1,3 \times 10^5$	$\leq$	$1,7 \times 10^6$	$\leq$	$3,3 \times 10^{6b}$
Queijo com 0,5% de orégano + 0,5% de salsinha	$3,1 \times 10^6$	$\leq$	$4,7 \times 10^6$	$\leq$	$6,3 \times 10^{6a}$

<sup>a, b</sup> Letras diferentes denotam diferenças significativas.