

JULIANA VICTORINO DA SILVA

**QUALIDADE MICROBIOLÓGICA E OCORRÊNCIA
DE LEVEDURAS EM DIFERENTES AMOSTRAS DE
QUEIJO TIPO “MINAS FRESCAL”**

JULIANA VICTORINO DA SILVA

**QUALIDADE MICROBIOLÓGICA E OCORRÊNCIA
DE LEVEDURAS EM DIFERENTES AMOSTRAS DE
QUEIJO TIPO “MINAS FRESCAL”**

**Dissertação apresentada ao Instituto de
Biotecnologia, Letras e Ciências Exatas da
Universidade Estadual Paulista “Júlio de
Mesquita Filho”, Campus de São José do
Rio Preto, para obtenção do título de Mestre
em Engenharia e Ciência de Alimentos.**

Orientador: Prof. Dr. Fernando Leite Hoffmann

São José do Rio Preto, 2003

JULIANA VICTORINO DA SILVA

**QUALIDADE MICROBIOLÓGICA E OCORRÊNCIA DE
LEVEDURAS EM DIFERENTES AMOSTRAS DE QUEIJO
TIPO “MINAS FRESCAL”**

COMISSÃO JULGADORA

DISSERTAÇÃO PARA OBTENÇÃO DO GRAU DE MESTRE

Presidente e Orientador : Prof. Dr. Fernando Leite Hoffmann

2º Examinador: Profa. Dra. Iracema de Oliveira Moraes

3º Examinador: Profa. Dra. Ana Lúcia Barretto Penna

São José do Rio Preto, 14 de março de 2003

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Microbiologia de Alimentos, Departamento de Engenharia e Tecnologia de Alimentos do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas de São José do Rio Preto (IBILCE), Universidade Estadual Paulista (UNESP).

Aos meus pais, Ary e Regina, pela vida, pelo amor incondicional, pelos esforços não medidos para a minha formação profissional, por estarem ao meu lado compartilhando de todos os momentos, principalmente os mais difíceis.

À vocês minha eterna gratidão.

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador Prof. Dr. Fernando Leite Hoffmann, pela oportunidade, paciência, compreensão, dedicação, e por não se importar em dividir seus conhecimentos;

Aos Professores Doutores Ana Lúcia Barretto Penna, Crispin Humberto Garcia Cruz, Elisa Yoko Hirooka e Iracema de Oliveira Moraes, membros da Banca Examinadora, pelos valiosos comentários e sugestões;

À Coordenação e a todos os Professores do Curso de Pós-Graduação, pela disposição em nos ajudar e pelos ensinamentos transmitidos durante o Mestrado, respectivamente;

À Auxiliar Acadêmica do Departamento de Engenharia e Tecnologia de Alimentos, Tânia Maria Vinturim Gonçalves, pelo incansável auxílio, amizade, disposição e paciência;

Ao Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas de São José do Rio Preto, UNESP, pela oportunidade, qualidade de ensino e receptividade;

A Seção de Pós-Graduação (Rosemar Rosa de Carvalho Brena), pelos inúmeros esclarecimentos e auxílios;

Ao Auxiliar Acadêmico Josué Rodrigues dos Santos pelas fotos.

Aos amigos de Pós-Graduação, (Fátima Ap. Carnicel, Jacqueline T. M. Peresi, Graziela M. de Queiroz, Patrícia de C. Damy, Sílvia Helena R. Barbosa, Ana Lúcia Coltro, Márcia V. S. Pinheiro, Fernanda Pieroni, Giane Ap. S. c. Stuchi, Alexandre R. Coelho), pelo apoio e amizade;

Aos meus irmãos Ary, pelo incentivo, pelas palavras amigas nos momentos difíceis, pela determinação, na qual muitas vezes me espelhei para continuar esta caminhada, ao Augusto, pela oportunidade de me conceder o primeiro estágio em Laboratório de Alimentos (Sadia), no qual descobri minha verdadeira paixão e pela torcida, mesmo de longe, para que tudo terminasse bem;

Ao meu noivo Álvaro pela descoberta de Rio Preto, pelo apoio constante, respeito a minha profissão, pela confiança, compreensão de minha ausência, paciência de ouvir os meus desabafos, pelo amor incondicional, por estar ao meu lado e me proporcionar momentos de felicidade, muito obrigada;

Aos meus pais, pelo amor, pela ajuda financeira, por acreditar em meus objetivos, por nunca me desampararem, me transmitindo calma, segurança, abdicando de seus sonhos para que eu pudesse viver o meu, esquecendo muitas vezes deles próprios e vivendo para e por mim, muito grata;

À Deus pela vida e por mais uma vez, me acompanhar.

“O verdadeiro heroísmo consiste em persistir por mais um momento quando tudo parece perdido”.

(W. E. Grenfel)

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	iv
LISTA DE TABELAS.....	vi
RESUMO.....	vii
ABSTRACT.....	ix
1.INTRODUÇÃO.....	01
2.OBJETIVOS.....	08
3.REVISÃO DA LITERATURA.....	09
4.MATERIAL E MÉTODOS.....	36
4.1.Obtenção das amostras.....	36
4.2.Preparo das amostras.....	36
4.3.Contagem de bactérias aeróbias mesófilas (total de microrganismos aeróbios estritos e facultativos viáveis).....	37
4.4.Enumeracão de bolores e leveduras.....	37
4.5.Contagem de <i>Staphylococcus aureus</i>	37
4.6.Determinacão do Número Mais Provável (NMP) de coliformes totais.....	38
4.7.Determinacão do NMP coliformes fecais.....	38
4.8.Pesquisa de <i>Escherichia coli</i>	39
4.9.Pesquisa de <i>Salmonella sp</i>	39
4.10.Pesquisa de <i>Listeria monocytogenes</i>	40
4.11.Isolamento das culturas de leveduras.....	40

4.12.Provas taxonômicas.....	41
4.12.1.Provas morfológicas.....	41
4.12.2.Provas fisiológicas.....	42
4.12.2.1.Capacidade fermentativa.....	42
4.12.2.2.Crescimento em diversas temperaturas.....	42
4.12.2.3.Crescimento em meio de cultura contendo nitrato.....	43
4.12.2.4.Produção de urease e prova “Diazonium Blue B Test” (D.B.B.).....	43
4.12.2.5.Resistência à pressão osmótica.....	43
4.12.2.6.Crescimento em meio de cultura contendo cicloheximida (actidione).....	44
4.12.2.7.Síntese de amido.....	44
4.12.3.Provas de assimilação de fontes de carbono.....	44
4.13.Ensaio de resistência aos principais conservantes alimentícios permitidos na legislação vigente.....	45
4.14.Prova de sensibilidade a um tratamento térmico (63 ⁰ C/30 min.).....	45
4.15.Técnica de “replica plate”	46
5.RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	57
5.1.Análises Microbiológicas.....	57
5.2.Isolamento das leveduras.....	66

5.3.Resistência aos principais conservantes alimentícios permitidos na legislação vigente.....	88
5.4.Sensibilidade a um tratamento térmico (63°C/30 min.).....	90
6.CONCLUSÕES.....	94
7.REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	95

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 - Fluxograma do processo de fabricação do queijo tipo “Minas Frescal”.....07
- Figura 2 - Características morfológicas das unidades formadoras de colônias de bolores e leveduras no Ágar Batata Dextrose acidificado com ácido tartárico a 10%.....47
- Figura 3 - Características morfológicas das unidades formadoras de colônias de *Staphylococcus aureus* no Ágar Telurito-Gema de Ovo.....48
- Figura 4 - Características morfológicas das unidades formadoras de colônias de *Staphylococcus aureus* rodeada por uma zona opaca e/ou um halo transparente (ação da lecitinase) no Ágar Telurito-Gema de Ovo.....48
- Figura 5 - Produção de gás, contido em tubos de Durham por coliformes totais utilizando-se a técnica dos tubos múltiplos, empregando-se o Caldo Lauril Sulfato Triptose.....49
- Figura 6 - Produção de gás, contido em tubos de Durham, por coliformes fecais utilizando-se a técnica dos tubos múltiplos, empregando-se o Caldo EC.....50
- Figura 7 - Caraterísticas morfológicas das unidades formadoras de colônias de *Escherichia coli* no Ágar Eosina Azul de Metileno.....51

Figura 8 - Caldo Lactosado (pré-enriquecimento) para a determinação de <i>Salmonella sp</i>	52
Figura 9 - Características morfológicas das unidades formadoras de colônias de <i>Salmonella sp</i> no Ágar <i>Salmonella Shigella</i>	52
Figura 10 - Técnica de “replica-plate” utilizada para identificação de leveduras.....	53
Figura 11 - <i>Candida edax</i> submetida a coloração de Gram, observada em microscópio óptico comum, aumento 1600x	54
Figura 12 - <i>Cryptococcus albidus</i> submetida a coloração de Gram, observada em microscópio óptico comum, aumento 1600x.....	54
Figura 13 - <i>Cryptococcus laurentii</i> submetida a coloração de Gram, observada em microscópio óptico comum, aumento 1600x.....	55
Figura 14 - <i>Debaryomyces hansenii</i> var. <i>fabryii</i> submetida a coloração de Gram, observada em microscópio óptico comum, aumento 1600x	55
Figura 15 - <i>Saccharomyces cerevisiae</i> submetida a coloração de Gram, observada em microscópio óptico comum, aumento 1600x.....	56

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Apresentação dos resultados das análises microbiológicas obtidos das diferentes amostras de queijo tipo “Minas Frescal” adquiridas em feiras livres.....	64
Tabela 2 - Freqüência relativa dos quatro gêneros de leveduras isoladas.....	71
Tabela 3 - Resultados das provas morfológicas, fisiológicas e assimilação apresentados pelas leveduras.....	72
Tabela 4 - Freqüência relativa dos três gêneros de leveduras resistentes a um tratamento térmico de 63 ⁰ C por 30 minutos.....	92
Tabela 5 - Freqüência relativa dos quatro gêneros de leveduras sensíveis a um tratamento térmico de 63 ⁰ C por 30 minutos.....	93

ABSTRACT

Thirty-one different samples of “Minas Frescal” handmade cheese, obtained at open markets in municipalities of the State of São Paulo (Bady Bassitt, Bauru, Mirassol, Potirendaba and São José do Rio Preto), were submitted to the following microbiological analyses: *Staphylococcus aureus* count, determination of the Most Probable Number (MPN) of total and fecal coliforms, analysis for the presence of *Escherichia coli*, *Salmonella sp* and *Listeria monocytogenes*, according to Brazilian food safety regulations. Analyses also included mesophil aerobic bacteria count (total of viable strict and facultative aerobic microorganisms) and the enumeration of yeast and mold. One hundred fifty-five yeast cultures were isolated from the samples. They were submitted to taxonomic, morphological, and physiological tests, and to carbon source assimilation tests, as well. Furthermore, the cultures were also tested for resistance to the food preservatives sodium benzoate and potassium sorbate in different concentrations, and for sensibility to thermal treatment. According to the results obtained, 30 samples (96.80%) of “Minas Frescal” cheese were observed to not to comply with one or more standards set by the Brazilian regulations. The results of the taxonomic tests showed the occurrence of 4 types of yeast: *Candida edax* represented by 59 cultures (38.06%); 2 species of *Cryptococcus*, i.e., *Cryptococcus albidus*, 3 cultures (1.94%), and *Cryptococcus laurentii*, 7 cultures (4.52%);

Debaryomyces hansenii, var. *fabryii*, represented by 85 cultures (54.84%); and *Saccharomyces cerevisiae*, one culture (0.64%). In some cases, yeasts of the same species were observed to differ in one or more characteristics of the standard description.

As regards to the behavior of cultures in face of the preservatives, all of them were verified to be sensitive to sodium benzoate at concentrations of 0.1, 0.2 and 0.4% and to potassium sorbate at 0.05, 0.1, 0.2 and 0.4%. Concerning thermal treatment, the results obtained showed that from the 155 yeasts isolated (100.00%) only 21 (13.55%) were resistant to treatment. Of these, 8 (38.10%) are represented by *Candida edax*, one (4.76%) by *Cryptococcus albidus*, 2 (9.52%) by *Cryptococcus laurentii*, and 10 (47.62%) by *Debaryomyces hansenii*, var. *fabryii*.

RESUMO

Trinta e uma diferentes amostras de queijo tipo “Minas Frescal” fabricadas artesanalmente, obtidas de feiras livres em municípios do Estado de São Paulo (Bady Bassitt, Bauru, Mirassol, Potirendaba e São José do Rio Preto), foram submetidas às seguintes análises microbiológicas: contagem de *Staphylococcus aureus*, determinação do Número Mais Provável (NMP) de coliformes totais e fecais, pesquisa de *Escherichia coli*, *Salmonella sp* e *Listeria monocytogenes*, de acordo com a legislação brasileira, incluindo ainda a contagem de bactérias aeróbias mesófilas (total de microrganismos aeróbios estritos e facultativos viáveis) e a enumeração de bolores e leveduras. Das amostras, foram isoladas cento e cinqüenta e cinco culturas de leveduras que foram submetidas às provas taxonômicas, morfológicas, fisiológicas e de assimilação de diversas fontes de carbono. Além disso, as leveduras foram também testadas quanto a resistência aos conservantes alimentícios benzoato de sódio e sorbato de potássio em diferentes concentrações, assim como com relação a sensibilidade ao tratamento térmico. De acordo com os resultados obtidos, observou-se que trinta (96,80%), das trinta e uma amostras de queijo tipo “Minas Frescal”, apresentaram-se em desacordo com um ou mais padrões da legislação brasileira. Os resultados das provas taxonômicas demonstraram a ocorrência de quatro gêneros de leveduras, a saber: *Candida edax* representada por cinqüenta e nove

culturas (38,06%), *Cryptococcus*, duas espécies, ou seja, *Cryptococcus albidus* por três culturas (1,94%) e *Cryptococcus laurentii* por sete (4,52%), *Debaryomyces hansenii* var. *fabryii* representada por oitenta e cinco (54,84%) e *Saccharomyces cerevisiae* por uma (0,64%). Observou-se que as leveduras de mesmas espécies, em alguns casos, diferiram em uma ou mais características da descrição padrão.

Em relação ao comportamento das mesmas frente aos conservantes, verificou-se que todas foram sensíveis ao benzoato de sódio nas concentrações de 0,1; 0,2 e 0,4% e ao sorbato de potássio a 0,05; 0,1; 0,2 e 0,4%. Para a sensibilidade ao tratamento térmico os resultados obtidos demonstraram que das cento e cinquenta e cinco leveduras isoladas (100,00%) apenas vinte e uma (13,55%) foram resistentes a tal tratamento. Destas, oito (38,10%) estão representadas por *Candida edax*, uma (4,76%) por *Cryptococcus albidus*, duas (9,52%) por *Cryptococcus laurentii* e dez (47,62) por *Debaryomyces hansenii* var. *fabryii*.

1. INTRODUÇÃO

O queijo “Minas Frescal” pode ser definido como produto fresco obtido por coagulação enzimática do leite com coalho e/ou outras enzimas coagulantes apropriadas, complementada ou não com ação de bactérias lácticas específicas (Brasil, 1997). Este deve ser ingerido geralmente nos primeiros quinze dias após a fabricação por tratar-se de um alimento perecível (Gurgel et al., 2000).

O tradicional queijo “Minas” é produzido no Brasil desde o período colonial; sua fabricação originou-se no Estado de Minas Gerais, com procedimentos caseiros desenvolvidos, principalmente, na cidade do Serro e na região da Serra da Canastra. A comercialização deste tipo de produto é mais acentuada nas zonas leiteiras da região Sul e Sudeste. Nos segmentos produtor e consumidor, o queijo “Minas” assume um caráter cultural constituindo-se, inclusive, produto de promoções turísticas em estâncias hidrominerais (Silva & Castro, 1995).

O consumo de leite e derivados lácteos é expressivo no país, sendo que o de queijo é de 2,3 quilos *per capita* ao ano. O Estado de Minas Gerais é o maior produtor, com cerca de duzentas e quinze mil toneladas por ano, o que corresponde a 50% da produção nacional (Martins, 2001). O consumo do queijo tipo “Minas” representa 16% em relação às outras variedades (Vilela et al., 2001).

Em Minas Gerais, a produção de queijos a partir de leite cru é uma atividade tradicional de vários municípios, que possui grande

importância na economia e identidade sócio-cultural do Estado, além de ser a principal atividade geradora de renda destas regiões (Furtado, 1980). Cerca de cento e vinte mil empregos diretos e quarenta mil indiretos são gerados. É produzido em quinhentos e dezenove dos oitocentos e vinte e três municípios mineiros, numa cadeia que reúne aproximadamente vinte e sete mil pequenos e médios produtores (Martins, 2001).

O aumento da produção leiteira, durante o período da safra, é acompanhado da queda de preços do leite e do queijo. O setor industrial, diante deste quadro, utiliza como alternativa para reduzir os custos de produção a política das quotas, pagando menos pela matéria-prima excedente. Contudo, a solução adotada pela indústria reduz a renda do produtor, o qual passa a utilizar alternativas diversas para contornar o problema e suprir suas necessidades econômicas. Assim, o leite excedente é destinado para a fabricação artesanal de produtos lácteos com predominância do queijo “Minas Frescal” (Pinto, Germano & Germano, 1996).

No Brasil, os laticínios identificam-se de maneira geral, com a elaboração de principalmente quatro tipos de produtos, ou seja, leite pasteurizado, em pó, queijos e produtos especiais, como iogurtes e sobremesas. Cabe, em geral, às indústrias menores a produção dos queijos “Minas” e Mussarela, enquanto que as maiores dedicam-se a

fabricação de produtos lácteos mais sofisticados, direcionados ao mercado de maior poder aquisitivo (Junior, 1984).

A origem do queijo “Minas” artesanal remonta ao século XVIII, durante a chamada “corrida do ouro” quando houve um grande afluxo de pessoas para o interior mineiro. Por esta ocasião, os portugueses teriam iniciado a fabricação de um queijo semelhante ao oriundo da Serra da Estrela em Portugal, que tornou-se a base para o desenvolvimento do produto mineiro (Vargas, Porto & Brito, 1998).

O processo de fabricação caseira pouco se alterou ao longo do tempo, não acompanhando a crescente demanda pela segurança higiênico-sanitária dos alimentos por parte dos mercados consumidores interno, externo e dos órgãos fiscalizadores oficiais. O seu processo de fabricação, mantém as mesmas técnicas antigas que foram transmitidas de pai para filho na região do Serro. Algumas mudanças em relação à metodologia inicial referem-se basicamente ao tipo de coalho que antes era obtido de estômago de bezerros, cabritos ou tatus e hoje é industrial (Faria et al., 2002).

O processamento industrial do queijo “Minas Frescal” é constituído resumidamente das seguintes etapas: pasteurização do leite, coagulação, corte, dessora, enformagem, salga, embalagem e refrigeração. Cada uma destas fases deve seguir normas operacionais pré-estabelecidas, de maneira a impedir que negligências ou falhas técnicas, permitam a contaminação do produto (Vieira & Neto, 1982).

O queijo se apresenta como uma rica fonte de proteína de alta qualidade, possui alto percentual de gordura e cálcio, contém fósforo, riboflavina e vitamina A (Câmara et al., 2002).

O queijo artesanal produzido sem controle sanitário e a partir de leite cru, este produto não recebe qualquer tratamento com o objetivo de diminuir a carga microbiana e de eliminar patógenos, caso presentes, sendo exposto ao consumo com qualidade duvidosa e potencialmente capaz de conter agentes causadores de doenças veiculadas por alimentos (Florentino & Martins, 1999). No entanto, devido a simplicidade de sua produção, este tipo de queijo que é vendido em feiras livres e outros estabelecimentos comerciais, é de fabricação caseira, utilizando geralmente o coalho (Peresi et al., 2001).

Apesar de ser um queijo tipicamente brasileiro, com grande popularidade, aceitação, consumo e produção em quase todo o país, a falta de fiscalização adequada, na sua elaboração, tanto industrial como artesanal, pode resultar em um produto sem padrão de qualidade. As indústrias de laticínios apresentam grande interesse na fabricação do queijo “Minas Frescal”, resumido em três tópicos: alto teor de umidade, rendimento e grande aceitabilidade no mercado consumidor (Gurgel et al., 2000).

A maioria dos queijos frescos tipo “Minas Frescal” consumidos pela população brasileira é proveniente de fazendas onde o acesso ao leite recém ordenhado é fácil e onde podem também ser fabricados. Este

produto geralmente não recebe nenhum tratamento para reduzir sua carga microbiana. Esta condição se agrava se não houver higiene durante a elaboração do mesmo e se for transportado ou armazenado sem refrigeração (Behmer, 1984).

O leite por sua riqueza nutritiva, constitui uma excelente fonte da transmissão de importantes zoonoses ao homem, tornando-se necessário que o mesmo seja produzido e comercializado para o consumo humano em condições de segurança e sem riscos para a saúde pública. De um modo geral, é obtido em más condições higiênico-sanitárias, apresentando altas contagens de microrganismos, constituindo-se em um risco à saúde do consumidor, principalmente quando consumido sem tratamento térmico (Tinôco et al., 2002).

A elaboração do queijo “Minas”, utilizando-se de procedimentos empíricos ou artesanais de fabricação, é conseqüência também dos custos elevados dos equipamentos industriais. Por outro lado, em geral, a matéria-prima usada, do ponto de vista higiênico-sanitário, não é de boa qualidade. Além disso, a mão de obra é desqualificada e não existe nenhum tipo de controle sobre a qualidade do produto final (Santos, 1982).

A contaminação microbiana de queijos assume destacada relevância em saúde pública ao se considerar que bactérias enterotoxigênicas e patogênicas como *Staphylococcus aureus*, *Listeria sp*

e *Salmonella sp* são comumente encontradas em derivados lácteos (Sena et al., 1999).

As leveduras, são agentes potenciais de deterioração, sendo uma das conseqüências do seu desenvolvimento no produto a elevação do pH, criando condições para o crescimento de outros microrganismos, inclusive patogênicos, desde que atinja valores superiores a 4,5. As mesmas desenvolvem turbidez, floculação, película e depósito. Elas podem ainda degradar ácidos orgânicos, promovendo o aumento de pH e formar o acetaldeído contribuindo também na fermentação de açúcar (International Commission on Microbiological Specifications for Foods-ICMSF, 1978).

Para se evitar ou controlar a contaminação desses produtos ou mesmo elaborá-los com maior segurança, é necessário selecionar matérias-primas de boa qualidade, utilizar pasteurização para reduzir a população microbiana, porém com os devidos cuidados para não se alterar as características inerentes e/ou desejáveis, evitar a contaminação pós-pasteurização e ainda, mantê-los em temperatura adequada (ICMSF, 1978).

Em termos industriais deverá também ser prática comum o monitoramento dos chamados pontos críticos de controle (Figura 1) para não aumentar a chance da ocorrência de outros contaminantes (ICMSF, 1978; ICMSF, 1980).

2. OBJETIVOS

2.1. Realizar as análises microbiológicas prescritas na legislação brasileira, assim como a enumeração de bolores e leveduras, em diferentes amostras de queijo tipo “Minas Frescal”,

2.2. Identificar as diversas leveduras isoladas deste tipo de alimento,

2.3. Verificar a resistência das mesmas em relação aos principais conservantes alimentícios permitidos na legislação brasileira, e

2.4. Investigar a sensibilidade dessas leveduras frente ao tratamento térmico.

3. REVISÃO DA LITERATURA

A utilização de leite cru para a fabricação do queijo tipo “Minas Frescal” é preocupante, pois este pode ser uma importante via de transmissão de inúmeros patógenos como *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Salmonella sp*, *Shigella sp* e *Listeria monocytogenes* entre outros (Borelli et al., 2000).

A baixa qualidade higiênica do leite cru, geralmente decorre da deficiente higiene na ordenha ou ainda conservação inadequada do leite ordenhado (Germano & Germano, 1995).

De acordo com pesquisa realizada sobre o leite tipo “C”, uma das matérias-primas que podem ser utilizadas para a produção de queijos, verificou-se que se o mesmo não apresentar qualidade higiênico-sanitária satisfatória, poderá ser veículo de contaminação microbiana, principalmente se não for adequadamente pasteurizado (Hoffmann, Garcia-Cruz & Vinturim, 1994a.; Hoffmann et al., 1994b.; Garcia-Cruz, Hoffmann & Vinturim, 1994).

As elevadas quantidades de bactérias mesófilas em alimentos, podem indicar que os mesmos foram preparados com matérias-primas altamente contaminadas, que o processamento foi insatisfatório do ponto de vista sanitário e ainda, que os alimentos foram estocados em condições inadequadas de tempo e temperatura (Leite Junior et al., 2000). Entretanto, a presença de altos níveis de mesófilos

não é usada para analisar as condições sanitárias de produtos lácteos fermentados, em cujo processamento são utilizados microrganismos (Feitosa, 1985).

Dentre os principais microrganismos capazes de ocasionar toxinfecções alimentares, podem ser citados o *Staphylococcus aureus* (coagulase positiva), produtor de enterotoxina, *Salmonella sp* e a *Listeria monocytogenes* (ICMSF, 1978).

A presença de *Staphylococcus aureus* é comumente detectada em queijos de fabricação artesanal, podendo o mesmo ocasionar riscos à saúde humana, de grandes proporções, sob o ponto de vista epidemiológico, pelo fato de algumas linhagens desta bactéria produzirem enterotoxinas termoestáveis, sendo cinco imunologicamente distintas, isto é, A, B, C, D e F que podem provocar toxinfecções alimentares que se manifestam como gastroenterite aguda de curto período de incubação (Wendpap & Rosa, 1993)

A ocorrência de tal microrganismo está também relacionada geralmente a prática de higiene e manipulação inadequada (Reibnitz & Tavares, 1995).

Os coliformes fecais são reconhecidos como indicadores de contaminação fecal, ou seja, condições higiênico-sanitárias inadequadas, visto presumir-se que a população deste grupo é composta de *Escherichia coli*, que tem como seu habitat exclusivo o trato intestinal do homem e de outros animais, sendo assim a mais importante indicadora

de contaminação fecal, ou melhor, aquela que quando presente garante o contato direto do alimento com as fezes (Guerreiro, 1984).

A presença de bolores e leveduras em queijos pode ser atribuída a má qualidade do produto, maneira inadequada de armazenamento, refrigeração intercalada de longos períodos de exposição a temperatura ambiente, sendo que a água de condensação do refrigerador, favorece ainda mais o crescimento de fungos na superfície dos queijos (Florentino & Martins, 1999).

Os bolores nestes produtos são comuns e podem representar um problema para o fabricante, durante a maturação, bem como para o varejista e consumidor, durante a estocagem, seja ela refrigerada ou não. O desenvolvimento desses microrganismos sempre foi considerado indesejável por causar perdas econômicas devido à descoloração, aparência desagradável, perda de sabor e também por serem capazes de produzir metabólitos tóxicos, conhecidos como micotoxinas (Taniwaki & Van Dender, 1991).

Segundo Rabelo et al. (2001) em exame microbiológico de queijo “Minas Frescal”, comercializado em Goiás, no período de junho a dezembro de 1999, procedeu-se, em cento e sessenta amostras de marcas comerciais, análises para *Staphylococcus aureus*, coliformes fecais e *Salmonella sp.* Cento e sete amostras (66,87%) estavam fora dos padrões legais; dentre estas, trinta e sete (34,58%) apresentaram *Staphylococcus aureus* e coliformes fecais acima dos padrões. Não foi

detectada *Salmonella sp.* Os resultados revelaram a baixa qualidade microbiológica do queijo “Minas Frescal” comercializado no Estado de Goiás.

Em estudos realizados por Câmara et al. (2002) foram analisadas vinte amostras de queijo tipo “Minas Frescal”, comercializadas no mercado municipal de Campo Grande, no Estado de Mato Grosso do Sul, no período de outubro a novembro de 2000. Dentre as amostras analisadas, quatro (20,0%) foram consideradas insatisfatórias por apresentarem coliformes fecais acima do limite permitido pela legislação, onze (55,0%) apresentaram coliformes fecais e *Staphylococcus aureus* acima do estabelecido, quatorze (70,0%) contagem de *S. aureus* acima de 10^3 unidades formadoras de colônias (UFC) / g, sendo que onze (78,6%) delas estavam com valores na faixa de risco, ou seja, com a possibilidade de ocorrer produção de enterotoxina, em quatorze (70,0%) identificaram a presença de *Escherichia coli*, e, apenas duas (10,0%) foram aprovadas para o consumo humano.

Rapini et al. (2002) realizaram avaliações microbiológicas de dez amostras de queijo tipo coalho comercializadas em praias nordestinas, por meio da pesquisa de *Salmonella sp.*, *Listeria sp.*, *Escherichia coli* e *Staphylococcus sp.* Das amostras analisadas, *Listeria* não foi detectada em nenhuma delas, *Salmonella sp* foi isolada de duas (20,0%) amostras e *Escherichia coli*, em apenas uma (10,0%). A contagem de *Staphylococcus sp* dos queijos analisados variou de $4,7 \times$

10^4 a $2,0 \times 10^7$ UFC / g, tendo apresentado uma média de $4,9 \times 10^6$ UFC / g; observaram que 100,0% das amostras apresentaram enumerações de *S. aureus* acima do nível máximo permitido (10^3). Das dez amostras analisadas foram isoladas cinquenta linhagens de *Staphylococcus*, sendo 46,0% de *Staphylococcus aureus*, 40,0% *Staphylococcus* coagulase negativa e 14,0% *Staphylococcus sp.* Observaram que em contagens de 10^4 UFC / g de *Staphylococcus sp* houve produção de enterotoxinas.

Trinta e três amostras de queijo “Minas” artesanal produzido na região do Serro-MG, foram analisadas com relação a qualidade microbiológica com referência a *Staphylococcus* coagulase positiva, *Salmonella sp*, *Listeria monocytogenes* e *Streptococcus sp*. De acordo com os resultados obtidos trinta e uma amostras (94,0%) de queijos frescos apresentaram-se impróprias para o consumo humano. Em relação a *Staphylococcus* coagulase positiva, trinta e uma (94,0%), mostraram contagens acima de 10^3 UFC / g, sendo que quatorze amostras (42,4%) apresentaram contagens superiores a 5×10^5 UFC / g. A estes níveis de contaminação já existe a possibilidade da produção de enterotoxina. Nenhuma amostra de queijo “Minas” fresco, apresentou contaminação por *Listeria monocytogenes*, *Salmonella sp* ou *Streptococcus sp* (Faria et al., 2002).

Em Goiás-GO, Nicolau, Kuaye & Mesquita (2001) pesquisaram vinte e nove amostras de queijo “Minas” produzidas em

laticínios do Estado, encontrando dezessete (58,6%) destas impróprias para o consumo.

Nascimento et al. (2001) avaliaram na região metropolitana de Fortaleza-CE, dezessete amostras de queijo coalho, das quais dezesseis (94,1%) estavam fora dos padrões vigentes.

Na contagem de *Staphylococcus* coagulase positiva, Vilela et al. (2001), encontraram onze amostras (15,7%) impróprias para o consumo, entre setenta de queijo “Minas Frescal” obtidas de pequenos laticínios de Juiz de Fora-MG e região. As contagens de *Staphylococcus* sp encontraram-se acima de 10^3 UFC / g.

Almeida Filho & Nader Filho (2000) verificaram a ocorrência de *Staphylococcus aureus* em oitenta amostras de queijo tipo “Minas Frescal”, comercializado no mercado municipal e em feiras livres da cidade de Poços de Caldas-MG. Destas, quarenta (50,0%) apresentaram contagens de *S. aureus* acima de 10^3 UFC / g, valor este estabelecido como sendo o limite máximo permitido. Os resultados revelaram que as médias geométricas das contagens de *S. aureus*, verificadas entre as amostras de queijo colhidas nos diversos pontos de venda, apresentaram valores da ordem de 10^5 UFC / g. Os maiores valores médios foram observados entre as adquiridas em feiras livres, ou seja, de $13,1 \times 10^5$ UFC / g.

Santos, Nogueira & Cunha (1995) verificaram a qualidade microbiológica de cinquenta e seis amostras de queijo tipo “coalho”

provenientes de diferentes pontos comerciais de Fortaleza-CE, com relação às contagens de bolores e leveduras, coliformes fecais e *Staphylococcus aureus*. De acordo com coliformes fecais trinta e oito amostras (67,9%) apresentaram valores fora dos padrões, para *Staphylococcus aureus*, os resultados mostraram valores acima dos padrões em trinta e cinco amostras (62,5%). Os produtos analisados demonstraram valores para bolores e leveduras variando de $1,4 \times 10^6$ a $5,2 \times 10^9$ UFC / g.

Com o objetivo de avaliar o queijo tipo “coalho” consumido no Estado da Paraíba foram analisadas quarenta amostras do produto, submetendo-as à contagem padrão em placas de microrganismos mesófilos, bolores e leveduras, presuntiva de *Staphylococcus aureus*, determinação do Número Mais Provável (NMP) de coliformes totais e fecais e pesquisa de *Salmonella sp.* Os resultados estatísticos indicaram, respectivamente, valores médios de $1,8 \times 10^7$ UFC / g; $6,5 \times 10^5$ UFC / g; $1,8 \times 10^5$ UFC / g; $6,7 \times 10^5$ NMP / g; $3,9 \times 10^4$ NMP / g. Foi constatada a presença de *Salmonella* em 30,0% das amostras (Florentino & Martins, 1999).

Foram submetidas a análises microbiológicas dez amostras de queijo tipo “Minas Frescal” obtidas de feiras livres da região de São José do Rio Preto-SP. Com relação aos resultados obtidos para bolores e leveduras foi verificada uma variação das contagens de $2,9 \times 10^5$ a $4,8 \times 10^8$ UFC / g; todas as analisadas (100,0%) apresentaram

Staphylococcus aureus fora do padrão estabelecido pela legislação vigente, sendo então classificadas pela mesma como “produtos potencialmente capazes de causar enfermidades transmitidas por alimentos” e portanto “produtos impróprios para o consumo humano”. Quanto a coliformes totais, foi verificada a presença deste grupo de microrganismos em todas elas (100,0%) e para fecais dez amostras (100,0%) apresentaram e confirmaram *Escherichia coli*, entretanto, só uma delas (10,0%), estava em desacordo com o padrão, podendo ser então classificada como “produto em condição higiênico-sanitária insatisfatória”. Oito (80,0%) se apresentaram em desacordo com a legislação federal, para *Salmonella sp* sendo classificadas como “produtos potencialmente capazes de causar enfermidades transmitidas por alimentos” e portanto “produtos impróprios para o consumo humano” (Hoffmann, Silva & Vinturim, 2002).

Na região central do Estado do Rio Grande do Sul foram coletadas trinta amostras de queijo colonial, não pasteurizado, em estabelecimentos que comercializam esse produto, ao longo de rodovias, sendo submetidas às análises microbiológicas de determinação do número mais provável de coliformes totais e fecais, pesquisa de *Salmonella sp*, bolores e leveduras, *Staphylococcus aureus* e de clostrídios sulfito-redutores. Encontraram contaminações de coliformes totais e fecais num índice que variou de $\leq 0,3$ a ≥ 1100 NMP / g de produto. As UFC de bolores e leveduras variaram de $< 1,0 \times 10^4$ a $> 2,5 \times$

10⁶. Colônias de *Staphylococcus aureus* foram encontradas em onze amostras e *Salmonella sp* e clostrídios sulfito-redutores não foram encontrados em nenhuma delas (Ritter, Santos & Bergmann, 2001).

Em estudo realizado com o objetivo de avaliar, por meio da pesquisa de *Salmonella sp*, contagem de *Staphylococcus aureus* coagulase positiva, NMP de coliformes totais e fecais, foram coletadas setenta amostras de diversas marcas comerciais de queijo tipo “Minas Frescal”, provenientes de quinze municípios do Estado de Goiás. Os resultados obtidos revelaram que quarenta e três (61,43%) estavam fora dos padrões legais vigentes. Dentre essas, vinte e seis (37,14%) foram classificadas como “produtos impróprios para o consumo humano” e cinco (7,14%) como “produtos em condições higiênico-sanitárias insatisfatórias” devido as contagens de *Staphylococcus* coagulase positiva. Quanto ao NMP de coliformes fecais, vinte e duas (2,86%) foram consideradas “produtos inaceitáveis para o consumo” e oito (11,42%) consideradas como “produtos em condições higiênico-sanitárias insatisfatórias”. Com relação a pesquisa de *Salmonella sp* não houve a presença desse microrganismo em nenhuma das amostras analisadas (Vieira et al., 2001b.).

Mendes, Numeriano & Coelho (1999) avaliaram a qualidade bacteriológica de cento e cinco amostras de queijo de “coalho” comercializadas em Recife, procedentes de quinze municípios pernambucanos, denominados de A a P, no tocante a *Salmonella sp*,

Staphylococcus aureus e coliformes. Observaram que os queijos provenientes do município C foram os que apresentaram maior índice de positividade para *Salmonella*, enquanto os dos municípios J, M, O e P, não apresentaram contaminação por este microrganismo. As amostras do município C, também apresentaram elevadas contagens de *Staphylococcus aureus*, com mais de 50,0% delas com índices superiores ao limite máximo permitido, de 10^3 UFC / g. Os queijos produzidos no município A foram os mais contaminados por *Staphylococcus aureus* sendo que, aproximadamente 90,0% das amostras se apresentaram fora do padrão. Em relação aos resultados do NMP de coliformes totais, verificaram que a maioria apresentou elevados índices, superiores ao limite máximo discriminado na tabela de McCrady.

Com o objetivo de avaliar a qualidade microbiológica de queijos tipo “Minas Frescal” fabricados artesanalmente, obtidos em feiras livres da região de São José do Rio Preto-SP, Silva et al. (2001) submeteram vinte e três amostras às seguintes análises: contagem de *Staphylococcus aureus*, determinação do NMP de coliformes totais e fecais, pesquisa de *Escherichia coli* e de *Salmonella sp.* Os resultados obtidos demonstraram que vinte e uma amostras (91,3%) apresentaram contagens de *S. aureus* fora do estabelecido na legislação sendo então classificadas pela mesma como “produtos em condições sanitárias insatisfatórias” e portanto “produtos impróprios para o consumo humano”. Com relação a determinação de coliformes fecais dezenove delas (82,6%)

apresentaram e confirmaram *E. coli*, sendo que seis (31,6%) estavam em desacordo com o padrão vigente, sendo então classificadas como “produtos em condições sanitárias insatisfatórias” e portanto “produtos impróprios para o consumo humano”. Das amostras analisadas dez (43,5%) apresentaram-se em desacordo com a legislação federal em relação a presença de *Salmonella sp* classificadas então como “produtos em condições sanitárias insatisfatórias” portanto “produtos impróprios para o consumo humano”.

Foi descrito por Silva & Castro (1995) a ocorrência de um surto de toxinfecção alimentar causado por queijo tipo “Minas”. Neste quinze pessoas foram expostas à fonte de infecção. Estas faziam parte de três famílias diferentes, que compartilharam o mesmo alimento, ou seja, um queijo fabricado artesanalmente de leite cru. A idade das pessoas envolvidas variou entre nove e oitenta e um anos, onde apenas uma não adoeceu. Os principais sintomas foram náuseas (53,3%), vômitos (66,3%), dores abdominais e cólicas (80,0%), febre (80,0%), calafrios (46,6%), desidratação (26,6%), dor de cabeça (73,2%), sudorese (73,3%) e fraqueza (80,0%). A análise do alimento suspeito revelou a presença de *Salmonella* do grupo D, *Staphylococcus aureus* (10^5 NMP / g) e coliformes fecais em número superior a $1,1 \times 10^5$ NMP / g. Das coproculturas realizadas em três pessoas do grupo (uma de cada família) isolou-se *Salmonella* do grupo D. Os autores concluíram que pode ter

ocorrido uma intoxicação causada por *S. aureus* e uma infecção por *Salmonella*.

No período de abril de 1998 a setembro de 1999, foram avaliadas as condições higiênico-sanitárias de trinta amostras de queijo tipo “Minas Frescal” artesanal comercializadas em dez feiras livres de São José do Rio Preto-SP e trinta industriais, coletadas em supermercados. As análises constituíram-se da determinação do NMP de coliformes fecais, enumeração de estafilococos coagulase positiva e pesquisa de *Salmonella* e *Listeria monocytogenes*. Os resultados microbiológicos revelaram sete (23,3%) amostras industriais e vinte e três (76,7%) artesanais em desacordo com os padrões previstos na legislação vigente, demonstrados principalmente pela presença de coliformes fecais e/ou estafilococos coagulase positiva em níveis elevados. Não houve isolamento de *Listeria monocytogenes* em nenhuma das amostras analisadas, enquanto que *Salmonella* foi detectada em duas (6,7%) artesanais (Peresi et al., 2001).

As cinco amostras de queijo tipo “Minas Frescal”, obtidas no comércio da cidade de Cuiabá-MT, no período de maio a junho de 1991, foram analisadas com relação à habilidade de produzir enterotoxinas. 40,0% delas apresentaram crescimento acima de 10^5 UFC / g no meio de cultura de Baird Parker e nenhum no de Vogel Johnson. A média de crescimento entre as amostras foi $7,8 \times 10^5$ UFC / g para Baird Parker e $2,3 \times 10^4$ UFC / g para Vogel Johnson. Concluíram que o alto

crescimento indicava risco, promovendo a produção de toxinas em condições sanitárias inadequadas (Wendpap & Rosa, 1993).

Corbia et al. (1999) estudaram e compararam os meios de cultura de Baird-Parker e Vogel-Johnson no isolamento de *Staphylococcus sp* de queijos tipo “Minas Frescal”, em quarenta e três amostras. Observaram o crescimento de colônias típicas (pretas, com formação de halo) em 74,42 e 81,39% dos queijos, respectivamente, para Baird-Parker e Vogel-Johnson. Houve concordância de resultados numéricos (UFC / g) em 23,26% (dez das quarenta e três amostras). No Baird-Parker, observou-se crescimento melhor (sem contaminação) e/ou maior número de UFC em 51,16% (vinte e duas das quarenta e três) dos obtidos comparados com o crescimento melhor e/ou maior número de UFC do Vogel-Johnson, de 23,26% (dez das quarenta e três). Concluíram que o meio de cultura Baird-Parker foi o melhor para o isolamento de *Staphylococcus sp* de queijos.

Sabione, Nascimento & Pereira (1994) verificaram a ocorrência de um surto de intoxicação alimentar por *Staphylococcus aureus* a partir do consumo de queijo “Minas” não pasteurizado, fabricado na fazenda e comercializado pelo próprio fabricante, sem qualquer refrigeração. O surto atingiu onze pessoas, das quais três foram hospitalizadas. A análise do queijo revelou níveis da ordem de 10^8 UFC / g indicando o *Staphylococcus aureus* como agente causador, sendo que

10⁶ UFC / g indica risco de intoxicação. Foram identificadas as toxinas A, B e D.

Em feiras livres de Blumenau-SC, vinte amostras analisadas de queijo colonial revelaram a presença de *Staphylococcus aureus* coagulase e DNase positivas, sendo que 95,0% destas se apresentaram fora dos padrões estabelecidos pela legislação vigente (Reibnitz & Tavares, 1995).

Oliveira et al. (1999) avaliaram a resistência bacteriana “in vitro” de cinquenta e oito isolados de *Staphylococcus* oriundos de queijos tipo “Minas Frescal”, comercializados no Rio de Janeiro, a quatorze antibióticos mais usados em medicina humana e veterinária. Empregaram a metodologia de Kirby-Bauer, usando discos de antibióticos e ágar Müeller Hinton. Das quatro linhagens de *Staphylococcus aureus*, 100,0% foram sensíveis à cefalexina (CX), vancomicina (VC), cefoperazona (CPZ), cefaclor (CFC), gentamicina (GN), cefalotina (CF), kanamicina (KN), novobiocina (NV), cefuroxima (CRX), lincomicina (LN), trimetropim (TRI), cefotaxina (CTX), sendo 50,0% resistentes à penicilina (PN) e 25,0% resistentes à bacitracina (BC). Das duas linhagens de *Staphylococcus sp* coagulase positiva testadas, 100,0% foram sensíveis aos quatorze antibióticos utilizados. Reforçaram a atenção para estudos sobre a origem dessas contaminações em alimentos.

Nascimento et al. (1999) identificaram a origem da contaminação do queijo “Minas Frescal”, por *Staphylococcus aureus*

coagulase positiva, através de exames microbiológicos. Em um estabelecimento de produção procuraram observar as condições higiênico-sanitárias gerais, das bancadas, formas, pipetas do coalho, utilizadas no preparo dos queijos, bem como das mãos dos manipuladores, do leite ao chegar, após “fervura” e do queijo pronto. Os resultados revelaram a presença de *S. aureus* coagulase positiva em uma das cinco formas amostradas, aleatoriamente, em dois latões de leite, nas mãos de um dos dois funcionários da queijaria e em uma das amostras de queijo fabricadas nesse dia. *Staphylococcus sp* coagulase negativa e positiva foram isolados, respectivamente, de duas (2/5) e uma (1/5) das formas.

A ocorrência de *Escherichia coli* enteropatogênica (EPEC), em queijos tipo “Minas Frescal”, em Ouro Preto-MG foi constatada em 9,8% das amostras submetidas a pesquisa bacteriológica, tendo sido isolados os sorotipos O26, O86, O125 e O127 (o mais freqüente); *E. coli* enteroinvasora (EIEC), sorogrupos O28ac também foram isolados em 5,9% das mesmas amostras. Embora a patogenicidade dos sorogrupos isolados seja discutível, os autores registraram o envolvimento dos sorogrupos O86 e O28ac em surtos na Romênia e em São Paulo, respectivamente. São contudo os sorogrupos O111 e O119 os mais encontrados em gastroenterites infantis (Nascimento, Sabione & Pimenta, 1988).

Pedro, Germano & Matté (2001) avaliaram dez amostras adquiridas aleatoriamente e comercializadas por ambulantes nas ruas da cidade de São Paulo-SP; observaram que 80,0% eram de origem clandestina e as restantes apresentaram marca e identificação do Serviço de Inspeção Federal (SIF); 90,0% delas apresentaram coliformes totais com contagens variando entre $2,4 \times 10^3$ e $> 2,4 \times 10^8$ UFC / 25 g; encontraram a presença de *Escherichia coli*. A contagem de mesófilos variou de $2,3 \times 10^4$ a $> 3,0 \times 10^7$ UFC / g; a de psicrófilos $2,14 \times 10^3$ e $2,45 \times 10^6$ UFC / g e a de bolores e leveduras $2,7 \times 10^3$ e $> 3,0 \times 10^7$ UFC / g. A pesquisa demonstrou que 70,0% das amostras eram consideradas como “produtos inaceitáveis para o consumo”.

Trinta e duas amostras de queijo tipo “Minas Frescal” foram coletadas no Estado do Rio de Janeiro, entre outubro de 1998 e março de 1999, com e sem carimbo do Serviço de Inspeção Federal (SIF), foram analisadas quanto a presença e/ou enumeração de coliformes fecais e *Escherichia coli*, usando a técnica do NMP. Foi evidenciado que dezesseis (50,0%) apresentavam um grau de contaminação por coliformes fecais acima do tolerado pela legislação vigente ($>10^3$), dessas, doze (75,0%) tinham SIF e treze (81,75%) não apresentavam SIF. *Escherichia coli* foi isolada, respectivamente, de quatorze (87,5%) e treze (81,25%) das amostras com coliformes fecais. Os autores concluíram que mesmo com carimbo do SIF, 50,0% dos

queijos sob estudos estavam impróprios para o consumo humano (Cunha et al., 1999).

Tavares & Garcia (1993) verificaram a presença de coliformes fecais e *Escherichia coli* em vinte amostras de queijo colonial comercializadas em feiras livres de Blumenau-SC. Das pesquisadas quatorze (70,0%) estavam fora dos padrões recomendados, deste percentual, quatro (28,57%) encontravam-se em condições higiênico-sanitárias insatisfatórias, seis (42,85%) foram consideradas “produtos inaceitáveis para o consumo direto” e quatro (28,57%) foram classificadas como “produtos impróprios para o consumo”. O isolamento de *Escherichia coli* ocorreu em quatro amostras (20,0%). Os autores concluíram que as condições de higiene do ambiente, utensílios e pessoal durante a produção do queijo colonial foram insatisfatórias.

A determinação do NMP de coliformes totais e fecais, foi efetuada em trinta e duas amostras de queijo tipo “Minas Frescal” e vinte de Mussarela, elaborados por seis fábricas de laticínios localizadas na região nordeste do Estado de São Paulo. Com relação as bactérias do grupo coliforme, quinze amostras (46,9%) de queijo “Minas” e três (15,0%) de Mussarela, apresentaram níveis acima de 10^3 / g. Teores de coliformes fecais acima do limite estabelecido pela legislação (10^2 / g) foram observados em apenas três (9,4%) de queijo “Minas” (Oliveira et al., 1998).

Almeida Filho & Nader Filho (2002) verificaram a ocorrência de coliformes fecais e de *Escherichia coli* em oitenta amostras de queijo tipo “Minas Frescal” comercializado na cidade de Poços de Caldas-MG. Os resultados evidenciaram a presença de coliformes fecais e de *E. coli* respectivamente em trinta (37,5%) e vinte e quatro (30,0%) das mesmas, cujas contagens revelaram valores médios de $3,4 \times 10^5$ UFC / g e $9,3 \times 10^4$ UFC / g, o que demonstrou valores superiores ao limite máximo permitido pelo Ministério da Saúde para este tipo de produto.

Foi avaliada a qualidade microbiológica e higiênico-sanitária do leite tipo “A” pasteurizado, comercializado na cidade de Descalvado-SP, baseada nos padrões estabelecidos pela legislação brasileira. Durante o período de agosto de 2000 à janeiro de 2001, cinquenta amostras foram coletadas e submetidas às análises de pesquisa de *Salmonella*, contagem padrão de bactérias aeróbias mesófilas e NMP de coliformes totais e fecais. Das amostras, dezoito (36,0%) para determinação de coliformes totais e nove (18,0%) para coliformes fecais, apresentaram valores acima dos padrões legais. Com relação as bactérias mesófilas, nenhuma apresentou resultado fora dos padrões estabelecidos pelo Ministério da Saúde. Os exames bacteriológicos para o isolamento de *Salmonella sp* demonstraram que não houve o desenvolvimento de nenhuma colônia característica da bactéria (Tessari & Cardoso, 2002).

Foram analisadas dez amostras de queijo de coalho tipo artesanal, comercializadas numa rede de supermercados de Natal-RN. Os resultados demonstraram, em relação a coliformes fecais, um valor máximo de $1,1 \times 10^3$ NMP / g, sendo que 60,0% delas estavam em desacordo com os padrões microbiológicos (Brasil, 1997). Concluiu-se que as condições higiênico-sanitárias foram insatisfatórias (Paiva & Cardonha, 1999).

Foram analisados surtos de toxinfecção alimentar em municípios do Estado de Minas Gerais, entre 1992 e 1994, comprovando como o principal alimento envolvido o queijo “Minas”, incluindo o tipo “Frescal”. Neste período, dos casos notificados, duzentas e trinta e nove pessoas foram expostas e aproximadamente duzentas e dezoito (91,28%) apresentaram sintomatologia característica, sendo que quarenta e nove (20,50%) foram hospitalizadas. Os sintomas mais freqüentes foram vômitos, cólicas abdominais e diarreia que surgiram a partir de trinta minutos após a ingestão do alimento suspeito. Os pacientes não apresentaram febre. Dos vinte e um surtos notificados, dezoito (85,71%) revelaram a presença de *Staphylococcus aureus* em contagens na faixa de 10^5 a 10^9 UFC / g do produto, treze (61,90%) apresentaram coliformes fecais com valores entre 10^3 a 10^5 NMP / g, indicando as más condições higiênico-sanitárias dos produtores (Dias et al., 1995).

De vinte e duas amostras analisadas de queijo tipo “Minas Frescal”, provenientes do município do Rio de Janeiro-RJ, dezenove

(86,36%), se mostraram em desacordo com a legislação apresentando contaminação por coliformes fecais, e destas, seis apresentaram-se também contaminadas com *Staphylococcus aureus* (31,57%). Os resultados mostraram que as amostras de queijo tipo “Minas Frescal” analisadas foram afetadas uma vez que apresentaram contaminação durante a manipulação, também pelas condições impróprias de transporte e, ainda, armazenamento à temperatura inadequada, o que aumenta os níveis de contaminantes pré-existentes nas mesmas (Sá Barreto & Pereira, 1999).

Catão & Ceballos (2001) investigaram a qualidade do leite “in natura” e na linha de produção (recém-pasteurizado e embalado), de uma usina de beneficiamento em Campina Grande-PB. Foi pesquisada a presença de *Listeria sp* e sua diversidade de espécies, os níveis de coliformes totais e fecais e *Escherichia coli*. Analisaram setenta e cinco amostras, sendo quarenta e cinco de leite cru, quinze de recém-pasteurizado e quinze de embalado. Os resultados foram reunidos em dois grupos segundo o período de monitoramento: antes e após as mudanças no processo de higienização da usina. Foi evidenciada uma elevada contaminação nas de leite cru nas duas épocas. Na primeira (março / abril de 1998), todas as de leite beneficiado estiveram fora dos padrões da legislação vigente para coliformes totais e fecais, na segunda (maio / agosto de 1998), houve acentuada redução dos níveis destas bactérias indicadoras, visto que 11,1% das recém-pasteurizadas estavam

fora dos padrões para coliformes totais e 33,3% para fecais. Das amostras embaladas, 22,2% estavam fora dos padrões para coliformes totais e 44,4% para fecais. Observaram que trinta e três (73,3%) das de leite cru e nove (30,0%) de pasteurizado estavam contaminadas com *Listeria sp*, sendo identificadas *L. monocytogenes* em dezessete (51,5%) de leite cru e em nove (100,0%) de beneficiado (quatro recém-pasteurizados e cinco embalados).

Vinte amostras de queijo “Minas Frescal light”, obtidas no comércio de Belo Horizonte-MG, foram analisadas quanto a qualidade microbiológica em relação a enumeração de coliformes fecais, pesquisa de *Salmonella sp*, *Listeria sp* e *Staphylococcus sp*. Três (12×10^3 , 2×10^5 e 2×10^5 UFC / g) foram reprovadas, de acordo com os padrões para coliformes fecais, sendo que dentre estas, uma apresentou *Staphylococcus* coagulase positiva. Todas foram negativas para *Listeria sp* e *Salmonella sp* (Souza et al., 2002).

O leite pasteurizado foi considerado suspeito, no surto de listeriose ocorrido em Boston, Estados Unidos, com o envolvimento de sete crianças e quarenta e dois adultos imunodeprimidos, ocasionando quatorze mortes (Fleming, 1985).

Queijo “tipo mexicano”, preparado a partir de leite sub-pasteurizado, resultou em quarenta e dois casos de listeriose, em um universo constituído por mulheres grávidas de origem hispânica e seus filhos. O microrganismo *Listeria sp* foi isolado, tanto do alimento, como de

pacientes e ainda de manipulador na linha de processamento (Linnan, 1988).

A presença de *Listeria sp* em queijos consumidos na Europa e no Canadá tem sido objeto de muitos estudos. A World Health Organization (WHO, 1988) relata que nos de textura mole e aqueles que são submetidos à maturação com fungos de coloração branca ou avermelhada, parecem oferecer melhores condições para o desenvolvimento da bactéria, possivelmente em função do aumento do pH.

Em fevereiro de 1988, uma mulher de quarenta anos, não gestante, sem comprometimento imunológico, desenvolveu meningite. O queijo "Anary", tipo frescal, que tinha sido produzido com leite de cabras, em Londres, foi a fonte da infecção. O mesmo sorotipo, 4b, do mesmo tipo de fago de *Listeria monocytogenes* foi isolado das fezes e líquido cérebro-espinhal da paciente e de quatro pacotes fechados da mesma partida do produto suspeito. O número de *L. monocytogenes* encontrado nessas embalagens fechadas variou de 3,0 a 5,0 x 10⁷ células / g (Azadian, Finnerty & Pearson, 1989).

A frequência da bactéria do gênero *Listeria*, foi estudada por Furlanetto, Santos & Hara (1996) em trinta amostras de queijo frescal e trinta de lingüiça, comercializadas na cidade de São Paulo-SP. Das sessenta analisadas vinte e duas (36,6%) estavam contaminadas por *Listeria sp*, sendo que em nove (15,0%) delas foram isoladas *Listeria*

monocytogenes. Das de queijo frescal analisadas oito (26,6%) estavam contaminadas com *Listeria sp*. Foi isolada *L. monocytogenes* 4b a partir de uma (3,3%) e *L. innocua* 6a de seis (20,0%). Em uma (3,3%) de queijo frescal foi isolada concomitantemente *L. monocytogenes* 4b e *L. innocua* 6a.

Vieira & Massaguer (1999) avaliaram a incidência de *Listeria sp* em queijos “Minas Frescal” obtidos em feiras livres e supermercados na região de Campinas-SP. Foram analisadas vinte amostras das quais foram obtidos cento e noventa e nove isolados que apresentaram colônias características de *Listeria*. Destes sessenta e oito (34,17%) confirmaram ser *Listeria monocytogenes*, noventa e dois (46,23%) *L. innocua*, dezessete (8,55%) *L. welshimeri*, um (0,5%) *L. seeligeri* e vinte e um (10,55%) não foram identificados como pertencentes a esse gênero. Os autores concluíram que 25,0% dos queijos continham *L. monocytogenes* caracterizando alta incidência.

Foram coletadas para a confirmação de *Listeria sp*, cento e vinte amostras de água, provenientes do ponto de descarga de efluentes de quatro indústrias de leite e derivados, das cidades de Goiânia e Anápolis-GO. Os resultados mostraram que dez (8,33%) revelaram-se positivas para *Listeria monocytogenes*, vinte e cinco (20,33%) para *L. innocua*, dezesseis (13,33%) para *L. welshimeri*, de um total de cinquenta e uma (42,50%) positivas para *Listeria sp* (Serafini et al., 1996).

Rodrigues, Vieira & Santos (1995) estudaram as características microbiológicas do queijo tipo “Minas Frescal” comercializado em Viçosa-MG, em sessenta e cinco amostras, sendo que 100,0% apresentaram elevadas contagens de *Staphylococcus aureus*, com média de $3,23 \times 10^7$ UFC / g, determinações de coliformes totais superiores, sendo o NMP máximo de 10^7 / g, a média do NMP de fecais foi $2,31 \times 10^5$ / g e concluíram que a mediana das contagens de bactérias mesófilas foi $2,8 \times 10^5$ UFC / g.

Foi realizado um estudo para avaliar, por meio da contagem de microrganismos mesófilos aeróbios e/ou facultativos viáveis e determinação do NMP de coliformes totais e fecais, as condições higiênico-sanitárias do leite pasteurizado tipo “C” comercializado em Goiás-GO, no período de janeiro a junho de 2000. Foram analisadas noventa e nove amostras de diferentes marcas comerciais, sendo quarenta e nove (49,49%) consideradas fora dos padrões legais vigentes. Dentre essas, oito (8,08%) foram classificadas como “produtos em condições higiênicas insatisfatórias”, devido às contagens de mesófilos, trinta e nove (39,39%) mostraram-se em desacordo com os padrões para coliformes totais, sendo vinte e três (23,23%) classificadas como “produtos impróprios para o consumo”. Quanto ao NMP de coliformes fecais, quatorze amostras (14,14%) foram classificadas como “produtos em condições higiênico-sanitárias insatisfatórias”, vinte (20,20%) foram

consideradas “produtos inaceitáveis para o consumo” e quatro (4,04%) como “produtos impróprios para o consumo” (Vieira et al., 2001a.).

No município de Ribeirão Preto-SP, treze amostras de queijo tipo “Minas Frescal” foram apreendidas pelo Serviço de Vigilância Sanitária da Prefeitura local, entre 1989 e 1990. Delas, 92,3% estavam em desacordo com os padrões físico-químicos e microbiológicos, sendo encontrados *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Salmonella sp*, clostrídios sulfito redutores, coliformes e bolores e leveduras (Laicini et al., 1993).

Tinôco et al. (2002) avaliaram a qualidade microbiológica de leites pasteurizados em indústrias e fazendas, ambos comercializados na cidade de Viçosa-MG, entre março e setembro de 1999. As análises foram realizadas em trinta amostras do produto pronto para o consumo, avaliando-se a população de bactérias mesófilas, o NMP de coliformes totais e fecais e a presença de *Salmonella*. O NMP máximo de coliformes fecais ocorreu em 45,0% delas. A população máxima de mesófilos foi 10^6 UFC / g e a *Salmonella* esteve ausente em todas as analisadas.

As leveduras apresentam duas características distintas: podem ser deterioradoras ou promotoras do processo tecnológico. A ação das mesmas sobre as proteínas e outras substâncias nitrogenadas é praticamente nula. Por outro lado alguns gêneros, como *Candida* e *Torulopsis*, são capazes de atuar sobre os lipídios (Franco & Landgraf, 1996).

A ocorrência de leveduras em produtos lácteos, foi estudada por Fleet (1990) que descreveu a taxonomia desses microrganismos em produtos como leite, creme, manteiga e outros não fermentados (leite em pó e sorvete); iogurte (métodos de controle na deterioração) e queijo (ocorrência e deterioração por leveduras e a contribuição dessas na maturação de vários tipos de queijo, como por exemplo no desenvolvimento de sabor e textura). Em seu trabalho, as encontradas foram *Kluyveromyces marxianus*, *Debaryomyces hansenii*, *Candida famata* e *Candida kefyr*.

As leveduras do gênero *Candida* são as mais comumente encontradas em carnes frescas bovinas e aves, estando também envolvidas em processos de deterioração de vários tipos de alimentos, principalmente em laticínios. *Cryptococcus*, tem por característica não realizar atividade fermentativa, é encontrada em solos, plantas e alimentos como morangos e outras frutas, pescados marinhos, camarões, carnes bovinas cruas, refrigerantes, vinhos e grãos de cereais; *Debaryomyces* tem pouca atividade fermentativa, elevada tolerância ao sal (18,0 a 20,0%) e pertence ao grupo das formadoras de películas nas superfícies de alimentos salgados ou mantidos em salmoura; *Saccharomyces*, caracteriza-se por intensa capacidade de fermentação, a espécie mais freqüentemente encontrada é a *cerevisiae*, empregada para as mais variadas finalidades, como produção de pães e bebidas, álcool, glicerol, invertases e em processos tecnológicos. Por outro lado, estão

envolvidas em alterações indesejáveis em muitos alimentos como produtos de laticínios e fermentados (Franco & Landgraf, 1996).

A conservação de alimentos sempre foi importante na vida do homem, desde que ele começou a viver em comunidade e a armazenar sua colheita. Os compostos como sal (NaCl), açúcar, ácidos e fumaças de madeira têm sido usados como conservadores de alimentos a muito tempo. A preservação é feita principalmente com o uso de conservadores químicos, os quais atuam como agentes antimicrobianos, protegendo os alimentos contra a contaminação por bolores, leveduras e bactérias (Tfouni & Toledo, 2001).

Os conservadores podem ser efetivos para preservar os alimentos, controlando o crescimento dos microrganismos ou destruindo diretamente todos ou parte deles (Davidson & Branden, 1981). De acordo com Sofos (1995), a escolha de um conservante para aplicação específica é baseada nos seguintes fatores: propriedades físicas e químicas (solubilidade, pKa, reatividade e toxicidade), tipos de microrganismo de interesse e propriedades do produto a ser conservado. O pH é provavelmente a propriedade que mais influencia na extensão da atividade antimicrobiana do conservador. Baixos pHs potencializam essa ação de ácidos minerais fracos (nitrito e sulfito) e de lipofílicos fracos (sorbico, benzoico e propiônico).

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Obtenção das amostras

Foram analisadas trinta e uma (100,00%) diferentes amostras de queijo tipo “Minas Frescal” fabricadas artesanalmente e embaladas sem o carimbo de nenhum serviço de inspeção, obtidas de feiras livres em municípios do Estado de São Paulo (Bady Bassitt, Bauru, Mirassol, Potirendaba e São José do Rio Preto). Tais amostras foram acondicionadas em caixas de material isotérmico (isopor) contendo cubos de gelo e transportadas de imediato ao Laboratório de Microbiologia de Alimentos (Harrigan & Mc Cance, 1976; ICMSF, 1978).

4.2. Preparo das amostras

No Laboratório cada amostra recebeu um código de identificação, ou seja, Q_n onde Q = queijo e n = número da amostra de queijo. A seguir, assepticamente 10 g da mesma foram triturados em almofariz com auxílio de pistilo e colocados em um frasco de Erlenmeyer contendo 90 mL de água destilada estéril sendo homogeneizados posteriormente (diluição 10^{-1}). A partir desta foram realizadas as demais diluições decimais seriadas, até 10^{-14} utilizando-se o mesmo diluente. As quatorze diluições obtidas foram usadas, conforme necessárias, nas análises subseqüentes (ICMSF, 1974; ICMSF, 1980).

4.3. Contagem de bactérias aeróbias mesófilas (total de microrganismos aeróbios estritos e facultativos viáveis)

Utilizou-se o método de semeadura por profundidade empregando-se o Ágar Padrão para Contagem, com incubação a 35⁰C por 48 horas (American Public Health Association-APHA, 1972; APHA, 1984).

4.4. Enumeração de bolores e leveduras

Pipetou-se assepticamente 1 mL de cada diluição e distribuiu-se em placas de Petri esterilizadas e identificadas. Adicionou-se a cada placa 15 mL de Ágar Batata Dextrose acidificado com ácido tartárico a 10% (pH = 4,0), ambos esterilizados; após solidificação incubou-se em estufa a 25⁰C por 5 dias. As unidades formadoras de colônias (UFC), foram calculadas de acordo com as diluições (ICMSF, 1978). Na Figura 2 estão apresentadas fotos de duas placas de Petri onde se observam as características morfológicas das UFC desses microrganismos.

4.5. Contagem de *Staphylococcus aureus*

Foram preparadas placas de Petri com Ágar Telurito-Gema de Ovo sobre o qual semeou-se por superfície 0,1 mL de cada diluição selecionada. Com o auxílio da alça de Drigalsky o inóculo (0,1 mL) foi cuidadosamente espalhado por toda a superfície do meio de

cultura até a total absorção. Posteriormente, as placas foram incubadas a 37⁰C por 24-48 horas. As UFC foram calculadas de acordo com as diluições e se apresentavam negras, brilhantes, convexas podendo ser rodeadas por zonas claras de 2 a 5 mm de diâmetro (conforme Figuras 3 e 4), foram submetidas também aos testes bioquímicos de confirmação principalmente Coagulase e Termonuclease (Speck, 1976).

4.6. Determinação do Número Mais Provável (NMP) de coliformes totais

Foi utilizada a técnica dos tubos múltiplos, empregando-se o Caldo Lauril Sulfato Triptose com incubação a 35⁰C durante 48 horas. A produção de gás, contido em tubos de Durham, está mostrada na Figura 5.

4.7. Determinação do NMP de coliformes fecais

Foi também usada a técnica dos tubos múltiplos, utilizando-se o Caldo EC com incubação a 44,5⁰C durante 24 horas (Brasil, 1981).

A determinação do NMP de coliformes totais e fecais foi realizada empregando-se a tabela de Hoskins (ICMSF, 1978).

4.8. Pesquisa de *Escherichia coli*

A partir dos tubos de ensaio contendo Caldo EC, usados na quantificação de coliformes fecais que apresentaram turvação, com ou sem gás no interior do tubo de Durham, (conforme Figura 6), foram semeadas placas de Petri contendo Ágar Eosina Azul de Metileno (Figura 7). As colônias suspeitas, que possuíam 2 a 3 mm de diâmetro e se apresentavam azuis com centro negro e bordas claras à luz transmitida, e brilho metálico-esverdeado à luz refletida, foram identificadas utilizando-se os testes bioquímicos, de Indol/Vermelho de Metila/Voges-Proskauer/Citrato-IMVIC (Marth, 1978; Speck, 1976).

4.9. Pesquisa de *Salmonella sp*

Em 225 mL de Caldo Lactosado e de Água Peptonada a 1% foram homogeneizados, respectivamente 25 g de cada amostra. Na Figura 8 mostra-se o Caldo Lactosado (pré-enriquecimento) para a determinação de *Salmonella sp*. Depois da incubação a 35⁰C por 24 horas, 1 mL de cada cultivo foi transferido para tubos de ensaio contendo 10 mL de Caldo Tetrionato de Kauffmann e para tubos com 10 mL de Caldo Selenito Cistina que foram incubados a 35⁰C. Após 24, 48 e 120 horas foram feitas semeaduras, em placas de Petri contendo Ágar *Salmonella Shigella* (Figura 9) e Ágar Verde Brilhante, sendo as colônias suspeitas submetidas aos testes bioquímicos (principalmente inoculação em Ágar Tríplice Açúcar e Ferro, Ágar Lisina e Ferro, teste de urease,

degradação do malonato, desaminação da fenilalanina e descarboxilação da lisina) e sorológicos (Brasil, 1981).

4.10. Pesquisa de *Listeria monocytogenes*

Em 225 mL de Caldo de Enriquecimento para *Listeria* (LEB) foram adicionados 25 g de cada amostra, homogeneizados e incubados a 30^oC por 24 e 48 horas (Mc Clain & Lee, 1989). Após o período de 24 horas, foi retirada uma alíquota de 0,1 mL e inoculada em Caldo de Enriquecimento Secundário Fraser (Fraser & Sperber, 1988), incubado a 35^oC por 24 horas.

Simultaneamente após a incubação uma alçada dos referidos caldos (LEB e Fraser) foi semeada por esgotamento diretamente em duas placas de Petri contendo Ágar Seletivo PALCAM-*Listeria* (Van Netter et al., 1989) e incubadas a 35^oC, em sistema de microaerofilia, por 24 e 48 horas.

4.11. Isolamento das culturas de leveduras

A partir do experimento realizado para enumeração de bolores e leveduras, isolou-se após cinco dias de incubação a 25^oC, cento e cinquenta e cinco culturas de todos os tipos morfológicos existentes, sendo que colônias mais numerosas no Ágar Batata Dextrose acidificado foram isoladas em maior proporção, visando conhecer aquelas predominantes. Em seguida, cada cultura pura recebeu um código de

identificação, ou seja, $Q_{n,n1}$ onde Q = queijo, n = número da amostra de queijo e $n1$ = número da levedura isolada desta amostra e foi estocada em tubos de ensaio de 12 x 100 mm contendo meio "Gymp" (glicose, extrato de levedura, extrato de malte, NaH_2PO_4 e ágar), para posterior identificação, sendo então coberta com óleo mineral para evitar ressecamento e mantida a $8 \pm 2^\circ\text{C}$. Posteriormente todas as culturas foram re-espalhadas em Ágar Sabouraud Glicose (glicose, peptona, extrato de levedura e ágar), de onde se fez a descrição da morfologia.

4.12. Provas taxonômicas

Nos testes taxonômicos (morfológicos e fisiológicos) foram empregados os métodos descritos por Kreeger Van Rij (1984) e Barnett, Payne & Yarrow, (1983 e 1990).

A identificação das culturas foi realizada segundo as chaves descritas por Barnett, Payne & Yarrow (1990) e Kurtzman & Fell (1998).

4.12.1. Provas morfológicas

Para a verificação da produção de esporos, foram utilizados, o meio de cultura de Gorodkova (glicose, peptona, NaCl e ágar) e o Ágar Acetato de McClary (glicose, KCl , extrato de levedura, acetato de sódio e ágar). As placas de Petri foram mantidas à temperatura ambiente e as observações feitas periodicamente entre 7, 14 e 21 dias.

4.12.2. Provas fisiológicas

4.12.2.1. Capacidade fermentativa

Para verificar a capacidade fermentativa das culturas foi utilizado o meio básico para fermentação (peptona e extrato de levedura). O mesmo foi colocado em tubos de ensaio de 12 x 100 mm contendo tubo de Durham invertido. Os açúcares foram esterilizados separadamente do meio de cultura.

Inicialmente foi testada a capacidade fermentativa frente à glicose. As culturas que apresentaram resultado positivo foram então submetidas a três dissacarídeos: sacarose, maltose e lactose.

Os tubos de ensaio foram mantidos a temperatura ambiente sendo as leituras feitas periodicamente entre 7 e 21 dias. Foi considerado resultado positivo quando 1/3 a 3/3 do tubo de Durham estava preenchido com gás e negativo quando não houve produção de gás (Kreeger Van Rij, 1984; Barnett, Payne & Yarrow, 1983 e 1990).

4.12.2.2. Crescimento em diversas temperaturas

Analisou-se a capacidade de crescimento a 35, 40 e 42^oC, utilizando-se o meio básico para fermentação (peptona e extrato de levedura) acrescido de 2,0% de glicose. Para a temperatura de 35^oC, os tubos de ensaio foram mantidos em estufa de incubação e para as demais foi utilizado o banho-maria. As leituras foram feitas através do Cartão de Whickerham (Kreeger Van Rij, 1984), após 48-72 horas de

incubação. Foi considerado crescimento positivo quando as linhas do cartão não foram visíveis e negativo quando estas foram visualizadas.

4.12.2.3. Crescimento em meio de cultura contendo nitrato

Foi utilizado o “Yeast Carbon Base” (YCB-Difco) contendo 0,078% de KNO_3 como fonte de nitrogênio e 2,0% de ágar (Kreeger Van Rij, 1984; Barnett, Payne & Yarrow, 1983 e 1990).

4.12.2.4. Produção de urease e prova “Diazonium Blue B Test” (D.B.B.)

Para estas provas foi utilizado o “Yeast Carbon Base” (YCB-Difco) acrescido de 2,0% de uréia filtrada em membrana “Millipore” (0,45 μm) e 0,02% de fucsina ácida, segundo metodologia descrita por Hagler & Mendonça-Hagler (1991).

4.12.2.5. Resistência à pressão osmótica

Neste teste, foram utilizadas duas substâncias distintas. O meio básico para ambas foi o Ágar Sabouraud Glicose. Para um dos testes, foi acrescentado 50% de glicose e para o outro 10% de NaCl (Kreeger Van Rij, 1984; Barnett, Payne & Yarrow, 1983 e 1990).

4.12.2.6. Crescimento em meio de cultura contendo cicloheximida (actidione)

Para esta prova foi utilizado o “Yeast Nitrogen Base” (YNB-Difco) acrescido de 1,0% de glicose, 2,0% de ágar e alíquotas de cicloheximida que variou de acordo com a concentração desejada (100 ou 1000 partes por milhão-ppm), segundo metodologia descrita por Kreeger Van Rij (1984).

4.12.2.7. Síntese de amido

Para a verificação da produção de compostos amilóides foi utilizado o Ágar Sabouraud Glicose. Após o crescimento das culturas, gotejou-se sobre as mesmas uma solução de lugol. O aparecimento de coloração azul escura indicará resultado positivo (Kreeger Van Rij, 1984; Barnett, Payne & Yarrow, 1983 e 1990).

4.12.3. Provas de assimilação de fontes de carbono

Foram utilizadas as seguintes substâncias: glicose, galactose, L-sorbose, maltose, sacarose, celobiose, trealose, lactose, melibiose, rafinose, melezitose, inulina, amido solúvel, D-xilose, L-arabinose, D-arabinose, D-ribose, L-ramnose, etanol, glicerol, eritritol, ribitol (adonitol), galactitol (dulcitol), D-manitol, D-glucitol (sorbitol), salicina, citrato, m-inositol e glicosamina. Todas as substâncias foram utilizadas na concentração de 0,5%, exceto a rafinose que foi a 1,0%,

acrescidas ao “Yeast Nitrogen Base” (YNB-Difco) mais 2,0% de ágar (Kreeger Van Rij, 1984; Barnett, Payne & Yarrow, 1983 e 1990).

4.13. Ensaio de resistência aos principais conservantes alimentícios permitidos na legislação vigente

Para esta prova foi utilizado o Ágar Sabouraud Glicose, pH = 3,0; onde foram acrescentados os conservantes alimentícios benzoato de sódio (código INS - 211) nas concentrações de 0,1; 0,2 e 0,4% e sorbato de potássio (INS - 202) nas de 0,05; 0,1; 0,2 e 0,4%. Para verificar o desenvolvimento microbiano, foi utilizado como controle o mesmo meio de cultura, porém sem a adição de conservante.

Para esta avaliação o pH do meio foi ajustado para 3,0, porque neste valor se obtém uma ótima atividade antimicrobiana dos conservantes empregados. Foram também esterilizados separadamente, por autoclavagem ou filtração em membrana Millipore (0,45 nm), o meio básico (sem o ágar), o ágar e os conservantes, para se evitar, em primeiro lugar, a hidrólise do ágar durante o aquecimento, com a perda do poder de gelificação e ainda no que se refere aos conservantes utilizados eventuais perdas por hidrólise ou evaporação.

4.14. Prova de sensibilidade a um tratamento térmico (63°C/30 min.)

Neste teste as respectivas culturas puras isoladas foram previamente inoculadas em tubos de ensaio contendo Caldo Nutriente e

incubadas a 25⁰C por 24 horas. Depois desse período tais tubos foram submetidos a temperatura de 63⁰C por 30 minutos em banho-maria, simulando um processo de pasteurização do tipo baixa temperatura, longo tempo. Após o tratamento térmico as leveduras foram então semeadas em placas de Petri com Ágar Nutriente com posterior incubação a 25⁰C. As leituras foram feitas após 5 dias de incubação.

4.15. Técnica de “replica-plate”

A técnica de “replica-plate” foi utilizada para as provas descritas nos itens 4.12.1., 4.12.2.3., 4.12.2.5. a 4.12.2.7., 4.12.3., 4.13 e 4.14.

Para o inóculo, culturas de 24-48 horas em meio “Gymp”, exceto para os itens 4.13. e 4.14., foram transferidas e pré-incubadas durante 3 a 5 dias à temperatura ambiente em “Yeast Nitrogen Base” (YNB-Difco) líquido contendo 0,1% de glicose, sendo agitadas periodicamente para o consumo do endógeno. A partir daí, cada inóculo foi transferido assepticamente para um sistema “replica-plate multitiped”, que permite a inoculação de vinte e cinco colônias/placa de Petri (Lederberg & Lederberg, 1952; Sheree Lin, Fung & Cox, 1987), apresentando crescimento posterior conforme mostrado na Figura 10.

Todas as placas de Petri foram incubadas em estufa a 25⁰C com leituras de 7, 14 e 21 dias de incubação, excetuando-se o item 4.14.

Tabela 1 - Apresentação dos resultados obtidos das diferentes amostras de queijo tipo “Minas Frescal” adquiridas em feiras livres.

Amostras n.	Bactérias aeróbias mesófilas (UFC/g)	Bolores e leveduras (UFC/g)	<i>Staphylococcus aureus</i> (UFC/g)	Coliformes totais (NMP/g)	Coliformes fecais (NMP/g)	<i>E. coli</i> (-/+)	<i>Salmonella</i> sp (-/+)	<i>Listeria monocytogenes</i> (+/-)
Q1	1,9 x 10 ⁹	2,2 x 10 ⁷	1,5 x 10 ⁷	> 1100	75	+	+	NR
Q2	1,7 x 10 ⁹	5,4 x 10 ⁷	4,5 x 10 ⁵	> 1100	11	+	-	NR
Q3	4,8 x 10 ⁷	2,9 x 10 ⁵	1,3 x 10 ⁶	> 1100	11	+	-	NR
Q4	1,1 x 10 ¹²	6,0 x 10 ⁷	5,4 x 10 ⁶	> 1100	7	+	+	NR
Q5	5,3 x 10 ¹¹	8,0 x 10 ⁷	2,1 x 10 ⁶	> 1100	11	+	+	NR
Q6	6,1 x 10 ¹¹	3,7 x 10 ⁶	4,5 x 10 ⁶	> 1100	11	+	+	NR
Q7	1,7 x 10 ¹²	8,6 x 10 ⁷	6,3 x 10 ⁴	> 1100	3	+	+	NR
Q8	2,6 x 10 ¹²	8,1 x 10 ⁷	3,9 x 10 ⁶	> 1100	14	+	+	NR
Q9	2,8 x 10 ¹²	4,8 x 10 ⁸	1,0 x 10 ⁶	> 1100	11	+	+	NR
Q10	7,2 x 10 ¹¹	1,5 x 10 ⁷	1,9 x 10 ⁵	> 1100	210	+	+	NR
Q11	1,7 x 10 ⁷	3,5 x 10 ²	8,7 x 10 ³	> 1100	< 3	-	+	-
Q12	1,9 x 10 ⁹	9,7 x 10 ⁴	7,2 x 10 ⁵	> 1100	460	+	+	-
Q13	1,4 x 10 ¹⁴	1,5 x 10 ⁵	6,7 x 10 ⁶	> 1100	3	+	+	-
Q14	1,8 x 10 ¹³	1,4 x 10 ⁶	1,7 x 10 ⁵	> 1100	< 3	-	-	-
Q15	1,6 x 10 ¹³	1,1 x 10 ⁶	2,0 x 10 ⁵	> 1100	11	+	-	-
PADRÃO FEDERAL (Brasil, 2001)			máximo 5 x 10 ² /g		máximo 5 x 10 ² /g		ausência 25g	ausência 25g

NR = Não Realizado

(continua)

Tabela 1 - Apresentação dos resultados obtidos das diferentes amostras de queijo tipo “Minas Frescal” adquiridas em feiras livres.
(continuação)

Amostras n.	Bactérias aeróbias mesófilas (UFC/g)	Bolores e leveduras (UFC/g)	<i>Staphylococcus aureus</i> (UFC/g)	Coliformes totais (NMP/g)	Coliformes fecais (NMP/g)	<i>E. coli</i> (-/+)	<i>Salmonella</i> sp (-/+)	<i>Listeria monocytogenes</i> (-/+)
Q16	$3,8 \times 10^{10}$	$9,5 \times 10^5$	$2,8 \times 10^6$	> 1100	11	+	+	-
Q17	$1,1 \times 10^6$	$4,7 \times 10^2$	$4,2 \times 10^5$	> 1100	7	+	-	-
Q18	$4,5 \times 10^{10}$	$1,8 \times 10^5$	$4,0 \times 10^3$	23	7	+	-	-
Q19	$1,1 \times 10^{13}$	$2,2 \times 10^4$	$1,1 \times 10^6$	> 1100	11	+	-	-
Q20	$3,5 \times 10^{13}$	$4,0 \times 10^5$	$7,2 \times 10^4$	28	11	+	-	-
Q21	$1,8 \times 10^6$	$1,1 \times 10^4$	$5,5 \times 10^5$	15	9	+	-	-
Q22	$3,4 \times 10^{13}$	$6,8 \times 10^3$	$9,5 \times 10^4$	28	< 3	-	-	-
Q23	$8,5 \times 10^8$	$5,4 \times 10^4$	$1,5 \times 10^6$	75	< 3	-	-	-
Q24	$3,7 \times 10^{13}$	$2,9 \times 10^5$	$9,3 \times 10^5$	> 1100	7	+	-	-
Q25	$5,1 \times 10^8$	$5,0 \times 10^4$	$1,0 \times 10^6$	> 1100	11	+	-	-
Q26	$3,0 \times 10^6$	$5,6 \times 10^4$	$3,4 \times 10^5$	11	< 3	-	-	-
Q27	$9,9 \times 10^{10}$	$6,6 \times 10^3$	$9,6 \times 10^5$	> 1100	< 3	-	-	-
Q28	$7,3 \times 10^{13}$	$1,5 \times 10^3$	$1,4 \times 10^5$	3	< 3	-	-	-
Q29	$1,6 \times 10^{14}$	$7,1 \times 10^2$	$1,7 \times 10^6$	> 1100	28	+	-	-
Q30	$1,8 \times 10^{14}$	$3,5 \times 10^6$	< 100	> 1100	28	+	-	-
Q31	$7,7 \times 10^{13}$	$1,6 \times 10^4$	$1,4 \times 10^6$	> 1100	11	+	-	-
Varição	$1,1 \times 10^6$	$3,5 \times 10^2$	< 100	3	< 3	-	-	
	a	a	a	a	a	a	a	
	$1,8 \times 10^{14}$	$4,8 \times 10^8$	$2,8 \times 10^6$	> 1100	460	+	+	
PADRÃO FEDERAL (Brasil, 2001)			máximo 5×10^2 /g		máximo 5×10^2 /g		ausência em 25g	ausência em 25g

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Análises Microbiológicas

Os resultados obtidos das diferentes análises microbiológicas, bem como a variação individual e global das contagens, determinações e/ou pesquisas dos microrganismos realizadas nas trinta e uma amostras de queijo tipo “Minas Frescal” (100,00%), estão apresentadas na Tabela 1.

Independentemente da existência de padrão microbiológico na legislação brasileira em vigor (Brasil, 2001) para bactérias aeróbias mesófilas, bolores e leveduras e coliformes totais, para esse tipo de produto, as amostras também foram submetidas a essas análises, para que se tivesse uma idéia dessas cargas microbianas e das condições higiênico-sanitárias destes alimentos, que muito provavelmente, poderão refletir as condições da matéria-prima, do ambiente e do pessoal. A contagem de bolores e leveduras variou de $3,5 \times 10^2$ a $4,8 \times 10^8$ UFC / g e o número mais provável de coliformes fecais de < 3 a 460 NMP / g. Analisando estes resultados com os dados apresentados por Florentino & Martins (1999), Pedro, Germano & Matté (2001) e Ritter, Santos & Bergmann (2001) verificou-se que a variação da contagem de bolores e leveduras obtidas neste trabalho foi superior àquela por eles encontrada, inferior as por Santos, Nogueira & Cunha (1995) e semelhantes a por Hoffmann, Silva & Vinturim (2002), a

determinação do NMP de coliformes fecais inferior a constatada por Almeida Filho & Nader Filho (2002), Câmara et al. (2002), Cunha et al. (1999), Florentino & Martins (1999), Hoffmann, Silva & Vinturim (2002), Oliveira et al. (1998), Paiva & Cardonha (1999), Peresi et al. (2001), Rabelo et al. (2001), Ritter, Santos & Bergmann (2001), Rodrigues, Vieira & Santos (1995), Sá Barreto & Pereira (1999), Santos, Nogueira & Cunha (1995), Silva et al. (2001) e Souza et al. (2002).

Como a legislação federal (Brasil, 2001), estabelece para *Staphylococcus aureus*, nesse produto, padrão de no máximo 5×10^2 / g, trinta amostras (96,80%) foram então classificadas pela mesma como “produtos em condições sanitárias insatisfatórias” e, portanto, “produtos impróprios para o consumo humano”. Os microrganismos dessas amostras também apresentaram resultados condizentes com os testes bioquímicos empregados. Este percentual foi superior aos encontrados em ordem decrescente por Faria et al. (2002), Silva et al. (2001), Mendes, Numeriano & Coelho (1999), Câmara et al. (2002), Peresi et al. (2001), Santos, Nogueira & Cunha (1995), Vieira et al. (2001b.), Almeida Filho & Nader Filho (2002), Ritter, Santos & Bergmann (2001), Rabelo et al. (2001), Souza et al. (2002) e Sá Barreto & Pereira (1999).

Segundo a ICMSF (1978), o *Staphylococcus aureus* pode ser transmitido ao alimento pelo manipulador, uma vez que possui como habitat as cavidades nasais, mãos, boca e outras partes do corpo humano.

O leite destinado à fabricação de queijos muitas vezes se contamina já no interior do útero, especialmente nos casos de mastite. *Staphylococcus aureus* é o principal agente etiológico desta enfermidade e, uma vez instalado na glândula mamária poderá chegar ao leite e conseqüentemente ao queijo (Almeida Filho & Nader Filho, 2000).

Quanto a coliformes totais, sem padrão para este tipo de produto na legislação, pode ser verificada a presença deste grupo de microrganismos em todas as trinta e uma amostras analisadas (100,00%).

Dos agentes bacterianos, os coliformes são internacionalmente considerados microrganismos indicadores da segurança microbiológica de alimentos (APHA, 1976).

Com relação a coliformes fecais, vinte e quatro amostras (77,40%) apresentaram e confirmaram *Escherichia coli*, entretanto nenhuma delas (0%) estava em desacordo com o padrão estabelecido na legislação brasileira e então foram classificadas como “produtos em condições sanitárias satisfatórias”, e portanto, “produtos de acordo com padrões legais vigentes”. Esta conclusão contradiz aquelas encontradas nos trabalhos realizados por Oliveira et al. (1998), Sá Barreto & Pereira (1999), Peresi et al. (2001), Silva et al. (2001), Vieira et al. (2001b.), Almeida Filho & Nader Filho (2002) e Hoffmann, Silva & Vinturim (2002).

A presença dos coliformes fecais com ênfase na *Escherichia coli*, tem sido relatada no leite que é usado para produção de queijos. Por serem bactérias termossensíveis, sua presença no leite

pasteurizado indicará contaminação posterior à pasteurização ou então pasteurização deficiente (Vessoni Penna, Baruffaldi & Colombo, 1986).

A ocorrência de altos níveis de coliformes em queijos pode estar associada, também, à baixa qualidade higiênica do leite cru, decorrente da higiene deficiente na ordenha, conservação inadequada do leite ordenhado ou prevalência de mastites no rebanho (Germano & Germano, 1995).

A presença de *Salmonella sp* foi constatada e/ou confirmada em doze (38,70%) das trinta e uma (100,00%) amostras analisadas, o que está em desacordo com o padrão da legislação federal, sendo então as mesmas classificadas como “produtos em condições sanitárias insatisfatórias”, e portanto, “produtos impróprios para o consumo humano”. Os microrganismos presentes apresentaram resultados condizentes para o gênero *Salmonella*, com relação à sorologia, assim como previamente aos testes bioquímicos, no Ágar Tríplice Açúcar e Ferro, Ágar Lisina e Ferro, sendo urease negativos, não metabolizando o malonato, não desaminando a fenilalanina e apresentando resultados positivos para a descarboxilação da lisina. O percentual obtido foi superior aos encontrados por Florentino & Martins (1999), Faria et al. (2002), Peresi et al. (2001), Rabelo et al. (2001), Ritter, Santos & Bergmann (2001), Silva et al. (2001), Souza et al. (2002) e Vieira et al. (2001b.) e inferior ao apresentado por Hoffmann, Silva & Vinturim (2002).

Inúmeros surtos de infecção alimentar por *Salmonella* são conhecidos, envolvendo os mais variados tipos de alimentos, principalmente os de origem animal (Jay, 2000). Casos onde estão envolvidos produtos de laticínios, comumente há ligação com o consumo de leite cru, leite pasteurizado de forma inadequada e queijos (Barros, Paiva & Panetta, 2002).

A contaminação desta bactéria em queijos pode ocorrer durante a fabricação, pela manipulação de portador com hábitos de higiene inadequados, ou pela utilização de matéria-prima contaminada em processos anteriores à elaboração do produto (Mossel & Garcia, 1984).

A presença deste microrganismo é utilizada para verificar a qualidade do produto para o consumo humano (Tessari & Cardoso, 2002) a legislação nacional e internacional determinam a ausência de qualquer espécie de *Salmonella* em 25 gramas ou mL de amostra dos alimentos analisados (Silva & Tibana, 1995).

Não houve isolamento de *Listeria monocytogenes* em nenhuma das amostras analisadas, fato coincidente com Faria et al. (2002), Peresi et al. (2001) e Souza et al. (2002), contradizendo aos encontrados por Furlanetto, Santos & Hara (1996) e Vieira & Massaguer (1999).

A bactéria do gênero *Listeria* é encontrada largamente distribuída na natureza e tem sido isolada de ambientes naturais, como solo, vegetação, águas residuais, fezes de animais, pessoas sadias,

animais portadores e em diversos tipos de alimentos, como carnes frescas ou produtos cárneos, frangos, pescados, leite e derivados, conforme evidenciados por Silva & Tibana, 1995.

Alguns fatores tornam o leite um dos produtos mais perigosos na transmissão de *Listeria monocytogenes*, pois, além de tratar-se de excelente meio de cultura, poderá ocorrer sua contaminação durante os processos de ordenha, transporte, resfriamento ou beneficiamento. A sua sobrevivência ou o seu desenvolvimento no leite refrigerado e, conseqüentemente nos seus subprodutos são favorecidos pela natureza psicrófila e possível termotolerância (Langoni & Fonseca, 1997).

Verificou-se finalmente que, das trinta e uma amostras analisadas (100,00%), trinta (96,80%) apresentaram-se em desacordo com um ou mais padrões da legislação brasileira, sendo que tais achados sugerem a qualidade inadequada das matérias-primas e/ou condições impróprias de processamento e estocagem, sendo ainda este percentual superior aqueles encontrados nos trabalhos realizados por Silva et al. (2001), Reibnitz & Tavares (1995), Nascimento et al. (2001), Faria et al. (2002), Laicini et al. (1993), Sá Barreto & Pereira (1999), Peresi et al. (2001), Pedro, Germano & Matté (2001), Tavares & Garcia (1993), Rabelo et al. (2001), Paiva & Cardonha (1999), Nicolau, Kuaye & Mesquita (2001), Cunha et al. (1999), Vieira et al. (2001b.) e Vilela et al. (2001) e

inferior aos apresentados por Hoffmann, Silva & Vinturim (2002) e Rapini et al. (2002).

Considerando-se a diversidade dos fatores envolvidos com a qualidade do queijo tipo “Minas Frescal”, principalmente sob o ponto de vista higiênico-sanitário, assim como a elevada incidência de patógenos constatados em estudos específicos e em surtos de toxinfecções, sugere-se a criação de programas de orientação voltados principalmente para os pequenos produtores e comerciantes deste tipo de produto, assim como a elaboração de normas básicas de higiene, necessárias para que o mesmo apresente qualidade microbiológica satisfatória.

5.2. Isolamento das leveduras

As leveduras submetidas aos testes taxonômicos estão apresentadas na Tabela 2.

As cento e cinqüenta e cinco isoladas de trinta e uma amostras de queijo tipo “Minas Frescal” pertencem a quatro gêneros: *Candida*, *Cryptococcus*, *Debaryomyces* e *Saccharomyces*.

Foram isoladas cinqüenta e nove culturas de *Candida edax* (38,06%), três de *Cryptococcus albidus* (1,94%), sete de *Cryptococcus laurentii* (4,52%), oitenta e cinco de *Debaryomyces hansenii* var. *fabryii* (54,84%) e uma de *Saccharomyces cerevisiae* (0,64%).

Pode-se verificar que as mesmas apresentaram variações em seus resultados, em relação à descrição padrão, conforme demonstra a Tabela 3.

As cinqüenta e nove leveduras identificadas como *Candida edax* diferiram da descrição padrão, só por assimilar inulina (Q24₂), e além de assimilar esta fonte de carbono, quarenta e cinco diferiram por crescerem em meio contendo 50% de glicose (Q2₈, Q2₁₁, Q3₈, Q5₂, Q6₃, Q7₄, Q8₁, Q8₂, Q9₂, Q10₁, Q10₂, Q13₅, Q13₈, Q14₅, Q15₁, Q15₃, Q17₄, Q18₉, Q19₁, Q19₄, Q19₅, Q19₆, Q19₇, Q19₈, Q19₉, Q20₂, Q21₃, Q21₄, Q21₅, Q22₂, Q23₆, Q24₃, Q24₆, Q26₁, Q27₂, Q27₃, Q27₉, Q27₁₀, Q29₁, Q29₂, Q29₃, Q29₅, Q29₇, Q29₁₀ e Q31₄), uma por crescer em meio contendo cicloheximida 100 ppm (Q12₄), seis por não crescerem em

meio contendo cicloheximida 1000 ppm (Q1₄, Q2₁₂, Q3₆, Q5₁, Q13₇ e Q20₃), quatro por produzirem pigmento (Q3₁, Q4₁, Q6₇ e Q7₂), uma por fermentar a glicose e lactose e outra por fermentar inclusive a sacarose (Q3₅ e Q7₁).

As leveduras descritas como *Cryptococcus albidus* (Q3₂, Q16₁ e Q27₇), diferiram da cultura padrão por assimilarem inulina e além disso, uma por não assimilar D-xilose, L-arabinose e melezitose e crescer em meio contendo 50% de glicose e duas por crescerem a 40^oC (Q3₅ e Q16₁)

As sete culturas identificadas como *Cryptococcus laurentii* diferiram desta levedura por crescerem em meio contendo nitrato, a 40^oC e por não formarem amido (Q1₁, Q2₁₃, Q12₁, Q13₃, Q13₆, Q14₂ e Q18₄).

Das oitenta e cinco leveduras descritas como *Debaryomyces hansenii* var. *fabryii*, oitenta e quatro diferiram da cultura padrão por crescerem em meio contendo nitrato, a 40^oC e por assimilarem m-inositol (Q2₂, Q2₄, Q2₅, Q2₇, Q8₃, Q8₄, Q9₃, Q9₄, Q11₁, Q12₃, Q13₁, Q13₂, Q13₄, Q13₅, Q13₉, Q14₁, Q14₃, Q14₄, Q14₆, Q14₈, Q14₉, Q14₁₀, Q15₂, Q16₃, Q17₁, Q17₃, Q18₁, Q18₂, Q18₃, Q18₅, Q18₆, Q18₇, Q18₈, Q18₁₀, Q18₁₁, Q19₂, Q19₃, Q20₁, Q20₄, Q20₅, Q21₁, Q21₆, Q22₁, Q22₃, Q22₄, Q22₅, Q22₆, Q22₇, Q22₈, Q22₉, Q22₁₀, Q23₁, Q23₂, Q23₃, Q23₄, Q24₁, Q24₄, Q24₅, Q26₂, Q26₃, Q26₄, Q26₅, Q26₆, Q26₇, Q26₈, Q26₉, Q27₁, Q27₄, Q27₅, Q27₆, Q27₈, Q29₈, Q29₉, Q30₁, Q30₂, Q30₃, Q31₁ e Q31₂), além disso, seis diferiram também por fermentarem a

lactose (Q7₃, Q21₂ e Q29₄), produzirem pigmentos (Q14₇ e Q31₃) e crescer em meio contendo 50% de glicose (Q29₆). Apenas uma (Q27₇), diferiu da cultura padrão, por somente crescer a 40⁰C e assimilar m- inositol.

Uma levedura identificada como *Saccharomyces cerevisiae* diferiu da descrição padrão por não fermentar a glicose, por assimilar a lactose e não a xilose (Q12₅).

O leite cru é um dos principais ingredientes de muitos produtos lácteos. Muitas vezes informações sobre leveduras para este tipo de alimento são apenas mencionadas a fim de detalhar os estudos bacteriológicos.

A taxonomia de leveduras no leite recebe uma pequena atenção, estudos descritos por Walker & Ayres (1970), relatam a ocorrência de leveduras pigmentadas do gênero *Rhodotorula*, Engel (1986), cita o isolamento de *Candida curvata* em amostras de leite cru.

A ocorrência de leveduras em vinte e seis amostras de leite pasteurizado, foi relatado por Fleet & Mian (1987), os quais isolaram as seguintes espécies: *Candida famata*, *Kluyveromyces marxianus*, *Cryptococcus flavus*, *Cryptococcus diffluens* e *Saccharomyces cerevisiae*; este crescimento ocorreu pelo fato da *Candida*, *Kluyveromyces* e *Cryptococcus* utilizarem a lactose, proteína ou gordura do leite, sendo esta conclusão não aplicada para *Saccharomyces cerevisiae*, onde

estudos estão sendo realizados para determinarem o substrato utilizado pela mesma.

Nakase & Komagata (1977), descreveram pesquisas realizadas com doze amostras de queijos importados da Europa e América do Norte, onde cinco delas, apresentaram contagens de leveduras entre 10^6 - 10^8 células (céls.) / g. As espécies mais freqüentemente isoladas foram *Debaryomyces hansenii* e *Candida lipolytica*.

Pesquisas relatadas por Fleet & Mian (1987), estudaram vinte e três amostras de queijo Cheddar da Austrália e demonstraram que 48,0% apresentavam contagens de leveduras em torno de 10^4 - 10^6 céls. / g e 37,0% das dezenove amostras de Cottage continham 10^5 - 10^7 céls. / g. As espécies encontradas, em ambos os queijos, foram: *Candida famata* (38,0%), *Kluyveromyces marxianus* (19,0%) e *Candida diffluens* (14,0%). Os autores puderam concluir que as culturas isoladas demonstraram capacidade de crescimento nos queijos Cheddar e Cottage durante o período de estocagem até 5⁰C por dez dias.

Boer & Kuik (1987) e Nooitgedagt & Hartog (1988), relataram as análises de duzentas e cinqüenta e seis amostras de queijos, entre eles Blue-veined, Brie, Camembert, Danablue, Roquefort e Gorgonzola. 87% das amostras de Gorgonzola e 77% de Roquefort apresentavam índices elevados para contagens de leveduras 10^7 - 10^8 céls. / g. Em relação ao isolamento e taxonomia, a espécie *Debaryomyces*

hansenii foi isolada com mais freqüência, sendo também encontradas *Kluyveromyces marxianus*, *Saccharomyces cerevisiae* e *Yarrowia lipolytica*. As amostras de queijos Brie e Camembert, revelaram que 60% destas, apresentavam uma população de leveduras maior que 10^6 céls. / g, sendo isoladas *Yarrowia lipolytica*, *Debaryomyces hansenii*, *Kluyveromyces marxianus* e algumas espécies de *Candida*, sendo que esta última predominava sobre as isoladas.

Segundo Martinez, Tesone & Quevedo (1986), a presença de leveduras nos queijos pode ser originária do leite, de contaminações durante a sua fabricação, de equipamentos de processo, meios de cultura para bactérias ácido lácticas, adição de sal ou cultura para fungos.

Tabela 2 - Frequência relativa dos quatro gêneros de leveduras isoladas.

Leveduras	Código das culturas	Porcentagem (n=155)
<i>Candida edax</i>	Q1 ₄ , Q2 ₈ , Q2 ₁₁ , Q2 ₁₂ , Q3 ₁ , Q3 ₅ , Q3 ₆ , Q3 ₈ , Q4 ₁ , Q5 ₁ , Q5 ₂ , Q6 ₃ , Q6 ₇ , Q7 ₁ , Q7 ₂ , Q7 ₄ , Q8 ₁ , Q8 ₂ , Q9 ₂ , Q10 ₁ , Q10 ₂ , Q12 ₄ , Q13 ₅ , Q13 ₇ , Q13 ₈ , Q14 ₅ , Q15 ₁ , Q15 ₃ , Q17 ₄ , Q18 ₉ , Q19 ₁ , Q19 ₄ , Q19 ₅ , Q19 ₆ , Q19 ₇ , Q19 ₈ , Q19 ₉ , Q20 ₂ , Q20 ₃ , Q21 ₃ , Q21 ₄ , Q21 ₅ , Q22 ₂ , Q23 ₆ , Q24 ₂ , Q24 ₃ , Q24 ₆ , Q26 ₁ , Q27 ₂ , Q27 ₃ , Q27 ₉ , Q27 ₁₀ , Q29 ₁ , Q29 ₂ , Q29 ₃ , Q29 ₅ , Q29 ₇ , Q29 ₁₀ e Q31 ₄	38,06%
<i>Cryptococcus albidus</i>	Q3 ₂ , Q16 ₁ e Q24 ₇	1,94%
<i>Cryptococcus laurentii</i>	Q1 ₁ , Q2 ₁₃ , Q12 ₁ , Q13 ₃ , Q13 ₆ , Q14 ₂ e Q18 ₄	4,52%
<i>Debaryomyces hansenii</i> var. <i>fabryii</i>	Q2 ₂ , Q2 ₄ , Q2 ₅ , Q2 ₇ , Q7 ₃ , Q8 ₃ , Q8 ₄ , Q9 ₃ , Q9 ₄ , Q11 ₁ , Q12 ₃ , Q13 ₁ , Q13 ₂ , Q13 ₄ , Q13 ₉ , Q14 ₁ , Q14 ₃ , Q14 ₄ , Q14 ₆ , Q14 ₇ , Q14 ₈ , Q14 ₉ , Q14 ₁₀ , Q15 ₂ , Q16 ₃ , Q17 ₁ , Q17 ₃ , Q18 ₁ , Q18 ₂ , Q18 ₃ , Q18 ₅ , Q18 ₆ , Q18 ₇ , Q18 ₈ , Q18 ₁₀ , Q18 ₁₁ , Q19 ₂ , Q19 ₃ , Q20 ₁ , Q20 ₄ , Q20 ₅ , Q21 ₁ , Q21 ₂ , Q21 ₆ , Q22 ₁ , Q22 ₃ , Q22 ₄ , Q22 ₅ , Q22 ₆ , Q22 ₇ , Q22 ₈ , Q22 ₉ , Q22 ₁₀ , Q23 ₁ , Q23 ₂ , Q23 ₃ , Q23 ₄ , Q23 ₅ , Q24 ₁ , Q24 ₄ , Q24 ₅ , Q26 ₂ , Q26 ₃ , Q26 ₄ , Q26 ₅ , Q26 ₆ , Q26 ₇ , Q26 ₈ , Q26 ₉ , Q27 ₁ , Q27 ₄ , Q27 ₅ , Q27 ₆ , Q27 ₇ , Q27 ₈ , Q29 ₄ , Q29 ₆ , Q29 ₈ , Q29 ₉ , Q30 ₁ , Q30 ₂ , Q30 ₃ , Q31 ₁ , Q31 ₂ e Q31 ₃	54,84%
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Q12 ₅	0,64%

Tabela 3 - Resultados das provas morfológicas, fisiológicas e de assimilação apresentados pelas leveduras.

Prova/Cultura	<i>Candida edax</i>									
	Q1 ₄	Q2 ₈	Q2 ₁₁	Q2 ₁₂	Q3 ₁	Q3 ₅	Q3 ₆	Q3 ₈	Q4 ₁	Q5 ₁
Pigmento	C	C	C	C	P	C	C	C	P	C
Esporos	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
F. glicose	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
F. maltose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
F. sacarose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
F. lactose	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
Glicose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Galactose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
L-sorbose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Maltose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Sacarose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Celobiose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Trealose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Lactose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Melibiose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Rafinose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Melezitose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Inulina	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Amido sol.	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D-xilose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
L-arabinose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D-arabinose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D-ribose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
L-ramnose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Etanol	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Glicerol	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Eritritol	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Ribitol	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Galactitol	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D-manitol	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D-glucitol	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Salicina	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Citrato	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
m-inositol	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Glicosamina	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Nitrato	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Glicose 50%	-	+	+	-	-	-	-	+	-	-
Ciclo.100ppm	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Ciclo.1000ppm	-	+	+	-	+	+	-	+	+	-
NaCl 10%	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Uréia	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D.B.B.	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Sínt. amido	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
35 ⁰ C	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
40 ⁰ C	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
42 ⁰ C	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-

(continua)

*C= creme; *P="pink"; F.= fermentação de; Amido sol.= amido solúvel; Ciclo.= cicloheximida; Sínt. de amido= Síntese de amido.

Tabela 3 - Resultados das provas morfológicas, fisiológicas e de assimilação apresentados pelas leveduras (continuação).

Prova/Cultura	<i>Candida edax</i>									
	Q5 ₂	Q6 ₃	Q6 ₇	Q7 ₁	Q7 ₂	Q7 ₄	Q8 ₁	Q8 ₂	Q9 ₂	Q10 ₁
Pigmento	C	C	P	C	P	C	C	C	C	C
Esporos	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
F. glicose	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
F. maltose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
F. sacarose	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
F. lactose	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
Glicose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Galactose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
L-sorbose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Maltose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Sacarose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Celobiose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Trealose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Lactose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Melibiose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Rafinose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Melezitose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Inulina	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Amido sol.	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D-xilose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
L-arabinose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D-arabinose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D-ribose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
L-ramnose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Etanol	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Glicerol	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Eritritol	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Ribitol	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Galactitol	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D-manitol	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D-glucitol	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Salicina	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Citrato	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
m-inositol	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Glicosamina	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Nitrato	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Glicose 50%	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+
Ciclo.100ppm	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Ciclo.1000ppm	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
NaCl 10%	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Uréia	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D.B.B.	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Sínt. Amido	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
35 ^o C	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
40 ^o C	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
42 ^o C	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

(continua)

*C= creme; *P="pink"; F.= fermentação de; Amido sol.= amido solúvel; Ciclo.= cicloheximida; Sínt. de amido= Síntese de amido.

Tabela 3 - Resultados das provas morfológicas, fisiológicas e de assimilação apresentados pelas leveduras (continuação).

Prova/Cultura	<i>Candida edax</i>									
	Q10 ₂	Q12 ₄	Q13 ₅	Q13 ₇	Q13 ₈	Q14 ₅	Q15 ₁	Q15 ₃	Q17 ₄	Q18 ₉
Pigmento	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C
Esporos	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
F. glicose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
F. maltose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
F. sacarose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
F. lactose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Glicose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Galactose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
L-sorbose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Maltose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Sacarose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Celobiose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Trealose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Lactose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Melibiose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Rafinose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Melezitose	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+
Inulina	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Amido sol.	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D-xilose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
L-arabinose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D-arabinose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D-ribose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
L-ramnose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Etanol	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Glicerol	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Eritritol	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Ribitol	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Galactitol	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D-manitol	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D-glucitol	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Salicina	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Citrato	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
m-inositol	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Glicosamina	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Nitrato	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Glicose 50%	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+
Ciclo.100ppm	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Ciclo.1000ppm	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+
NaCl 10%	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+
Uréia	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D.B.B.	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Sínt. Amido	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
35 ^o C	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
40 ^o C	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
42 ^o C	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

(continua)

*C= creme; *P="pink"; F.= fermentação de; Amido sol.= amido solúvel; Ciclo.= cicloheximida; Sínt. de amido= Síntese de amido.

Tabela 3 - Resultados das provas morfológicas, fisiológicas e de assimilação apresentados pelas leveduras (continuação).

Prova/Cultura	<i>Candida edax</i>									
	Q19 ₁	Q19 ₄	Q19 ₅	Q19 ₆	Q19 ₇	Q19 ₈	Q19 ₉	Q20 ₂	Q20 ₃	Q21 ₃
Pigmento	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C
Esporos	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
F. glicose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
F. maltose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
F. sacarose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
F. lactose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Glicose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Galactose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
L-sorbose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Maltose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Sacarose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Celobiose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Trealose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Lactose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Melibiose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Rafinose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Melezitose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Inulina	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Amido sol.	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D-xilose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
L-arabinose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D-arabinose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D-ribose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
L-ramnose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Etanol	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Glicerol	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Eritritol	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Ribitol	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Galactitol	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D-manitol	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D-glucitol	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Salicina	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Citrato	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
m-inositol	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Glicosamina	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Nitrato	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Glicose 50%	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+
Ciclo.100ppm	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Ciclo.1000ppm	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+
NaCl 10%	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Uréia	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D.B.B.	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Sínt. Amido	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
35 ^o C	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
40 ^o C	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
42 ^o C	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

(continua)

*C= creme; *P="pink"; F.= fermentação de; Amido sol.= amido solúvel; Ciclo.= cicloheximida; Sínt. de amido= Síntese de amido.

Tabela 3 - Resultados das provas morfológicas, fisiológicas e de assimilação apresentados pelas leveduras (continuação).

Prova/Cultura	<i>Candida edax</i>									
	Q21 ₄	Q21 ₅	Q22 ₂	Q23 ₆	Q24 ₂	Q24 ₃	Q24 ₆	Q26 ₁	Q27 ₂	Q27 ₃
Pigmento	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C
Esporos	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
F. glicose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
F. maltose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
F. sacarose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
F. lactose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Glicose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Galactose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
L-sorbose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Maltose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Sacarose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Celobiose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Trealose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Lactose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Melibiose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Rafinose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Melezitose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Inulina	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Amido sol.	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D-xilose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
L-arabinose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D-arabinose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D-ribose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
L-ramnose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Etanol	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Glicerol	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Eritritol	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Ribitol	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Galactitol	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D-manitol	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D-glucitol	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Salicina	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Citrato	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
m-inositol	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Glicosamina	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Nitrato	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Glicose 50%	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+
Ciclo.100ppm	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Ciclo.1000ppm	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
NaCl 10%	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+
Uréia	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D.B.B.	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Sínt. Amido	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
35 ^o C	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
40 ^o C	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
42 ^o C	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

(continua)

*C= creme; *P="pink"; F.= fermentação de; Amido sol.= amido solúvel; Ciclo.= cicloheximida; Sínt. de amido= Síntese de amido.

Tabela 3 - Resultados das provas morfológicas, fisiológicas e de assimilação apresentados pelas leveduras (continuação).

Prova/Cultura	<i>Candida edax</i>								
	Q27 ₉	Q27 ₁₀	Q29 ₁	Q29 ₂	Q29 ₃	Q29 ₅	Q29 ₇	Q29 ₁₀	Q31 ₄
Pigmento	C	C	C	C	C	C	C	C	C
Esporos	+	+	+	+	+	+	+	+	+
F. glicose	-	-	-	-	-	-	-	-	-
F. maltose	-	-	-	-	-	-	-	-	-
F. sacarose	-	-	-	-	-	-	-	-	-
F. lactose	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Glicose	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Galactose	+	+	+	+	+	+	+	+	+
L-sorbose	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Maltose	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Sacarose	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Celobiose	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Trealose	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Lactose	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Melibiose	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Rafinose	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Melezitose	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Inulina	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Amido sol.	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D-xilose	+	+	+	+	+	+	+	+	+
L-arabinose	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D-arabinose	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D-ribose	+	+	+	+	+	+	+	+	+
L-ramnose	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Etanol	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Glicerol	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Eritritol	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Ribitol	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Galactitol	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D-manitol	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D-glucitol	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Salicina	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Citrato	+	+	+	+	+	+	+	+	+
m-inositol	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Glicosamina	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Nitrato	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Glicose 50%	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Ciclo.100ppm	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Ciclo.1000ppm	+	+	+	+	+	+	+	+	+
NaCl 10%	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Uréia	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D.B.B.	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Sínt. Amido	-	-	-	-	-	-	-	-	-
35 ^o C	+	+	+	+	+	+	+	+	+
40 ^o C	+	+	+	+	+	+	+	+	+
42 ^o C	+	+	+	+	+	+	+	+	+

(continua)

*C= creme; *P="pink"; F.= fermentação de; Amido sol.= amido solúvel; Ciclo.= cicloheximida; Sínt. de amido= Síntese de amido.

Tabela 3 - Resultados das provas morfológicas, fisiológicas e de assimilação apresentados pelas leveduras (continuação).

Prova/Cultura	<i>Cryptococcus albidus</i>			<i>Cryptococcus laurentii</i>						
	Q3 ₂	Q16 ₁	Q24 ₇	Q1 ₁	Q2 ₁₃	Q12 ₁	Q13 ₃	Q13 ₆	Q14 ₂	Q18 ₇
Pigmento	C	C	C	P	P	P	P	P	P	P
Esporos	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
F. glicose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
F. maltose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
F. sacarose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
F. lactose	-	-	-	+	-	+	+	+	+	+
Glicose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Galactose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
L-sorbose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Maltose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Sacarose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Celobiose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Trealose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Lactose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Melibiose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Rafinose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Melezitose	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+
Inulina	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+
Amido sol.	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+
D-xilose	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+
L-arabinose	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+
D-arabinose	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+
D-ribose	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+
L-ramnose	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+
Etanol	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+
Glicerol	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+
Eritritol	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Ribitol	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Galactitol	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D-manitol	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D-glucitol	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Salicina	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Citrato	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
m-inositol	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Glicosamina	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Nitrato	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Glicose 50%	-	+	-	+	-	+	+	+	+	+
Ciclo.100ppm	-	-	-	+	-	+	-	+	+	-
Ciclo.1000ppm	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
NaCl 10%	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+
Uréia	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D.B.B.	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Sínt. Amido	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
35 ^o C	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
40 ^o C	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+
42 ^o C	+	+	-	+	+	+	+	-	+	-

(continua)

*C= creme; *P="pink"; F.= fermentação de; Amido sol.= amido solúvel; Ciclo.= cicloheximida; Sínt. de amido= Síntese de amido.

Tabela 3 - Resultados das provas morfológicas, fisiológicas e de assimilação apresentados pelas leveduras (continuação).

Prova/Cultura	<i>Debaryomyces hansenii</i> var. <i>fabryii</i>									
	Q2 ₂	Q2 ₄	Q2 ₅	Q2 ₇	Q7 ₃	Q8 ₃	Q8 ₄	Q9 ₃	Q9 ₄	Q11 ₁
Pigmento	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C
Esporos	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
F. glicose	+	+	+	-	+	-	-	+	-	-
F. maltose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
F. sacarose	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
F. lactose	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
Glicose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Galactose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
L-sorbose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Maltose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Sacarose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Celobiose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Trealose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Lactose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Melibiose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Rafinose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Melezitose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Inulina	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Amido sol.	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D-xilose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
L-arabinose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D-arabinose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D-ribose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
L-ramnose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Etanol	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Glicerol	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Eritritol	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Ribitol	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Galactitol	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D-manitol	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D-glucitol	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Salicina	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Citrato	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
m-inositol	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Glicosamina	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Nitrato	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Glicose 50%	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Ciclo.100ppm	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-
Ciclo.1000ppm	-	-	-	-	+	-	-	+	+	-
NaCl 10%	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Uréia	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D.B.B.	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Sínt. Amido	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
35 ^o C	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
40 ^o C	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
42 ^o C	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

(continua)

*C= creme; *P="pink"; F.= fermentação de; Amido sol.= amido solúvel; Ciclo.= cicloheximida; Sínt. de amido= Síntese de amido.

Tabela 3 - Resultados das provas morfológicas, fisiológicas e de assimilação apresentados pelas leveduras (continuação).

Prova/Cultura	<i>Debaryomyces hansenii</i> var. <i>fabryii</i>									
	Q12 ₃	Q13 ₁	Q13 ₂	Q13 ₄	Q13 ₉	Q14 ₁	Q14 ₃	Q14 ₄	Q14 ₆	Q14 ₇
Pigmento	C	C	C	C	C	C	C	C	C	P
Esporos	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
F. glicose	-	-	-	-	-	+	-	+	-	+
F. maltose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
F. sacarose	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+
F. lactose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
Glicose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Galactose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
L-sorbose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Maltose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Sacarose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Celobiose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Trealose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Lactose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Melibiose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Rafinose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Melezitose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Inulina	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Amido sol.	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D-xilose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
L-arabinose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D-arabinose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D-ribose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
L-ramnose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Etanol	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Glicerol	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Eritritol	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Ribitol	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Galactitol	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D-manitol	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D-glucitol	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Salicina	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Citrato	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
m-inositol	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Glicosamina	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Nitrato	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Glicose 50%	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Ciclo.100ppm	+	+	+	+	-	+	-	+	+	+
Ciclo.1000ppm	-	-	+	-	-	-	-	+	-	+
NaCl 10%	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Uréia	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D.B.B.	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Sínt. Amido	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
35 ^o C	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
40 ^o C	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
42 ^o C	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+

(continua)

*C= creme; *P="pink"; F.= fermentação de; Amido sol.= amido solúvel; Ciclo.= cicloheximida; Sínt. de amido= Síntese de amido.

Tabela 3 - Resultados das provas morfológicas, fisiológicas e de assimilação apresentados pelas leveduras (continuação).

Prova/Cultura	<i>Debaryomyces hansenii</i> var. <i>fabryii</i>									
	Q14 ₈	Q14 ₉	Q14 ₁₀	Q15 ₂	Q16 ₃	Q17 ₁	Q17 ₃	Q18 ₁	Q18 ₂	Q18 ₃
Pigmento	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C
Esporos	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
F. glicose	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+
F. maltose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
F. sacarose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
F. lactose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Glicose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Galactose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
L-sorbose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Maltose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Sacarose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Celobiose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Trealose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Lactose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Melibiose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Rafinose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Melezitose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Inulina	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Amido sol.	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D-xilose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
L-arabinose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D-arabinose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D-ribose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
L-ramnose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Etanol	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Glicerol	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Eritritol	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Ribitol	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Galactitol	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D-manitol	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D-glucitol	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Salicina	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Citrato	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
m-inositol	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Glicosamina	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Nitrato	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Glicose 50%	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Ciclo.100ppm	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+
Ciclo.1000ppm	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-
NaCl 10%	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Uréia	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D.B.B.	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Sínt. Amido	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
35 ^o C	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
40 ^o C	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
42 ^o C	+	+	+	-	+	+	+	-	-	+

(continua)

*C= creme; *P="pink"; F.= fermentação de; Amido sol.= amido solúvel; Ciclo.= cicloheximida; Sínt. de amido= Síntese de amido.

Tabela 3 - Resultados das provas morfológicas, fisiológicas e de assimilação apresentados pelas leveduras (continuação).

Prova/Cultura	<i>Debaryomyces hansenii</i> var. <i>fabryii</i>									
	Q18 ₅	Q18 ₆	Q18 ₇	Q18 ₈	Q18 ₁₀	Q18 ₁₁	Q19 ₂	Q19 ₃	Q20 ₁	Q20 ₄
Pigmento	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C
Esporos	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
F. glicose	-	-	-	+	-	+	-	+	+	-
F. maltose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
F. sacarose	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-
F. lactose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Glicose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Galactose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
L-sorbose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Maltose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Sacarose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Celobiose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Trealose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Lactose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Melibiose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Rafinose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Melezitose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Inulina	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Amido sol.	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D-xilose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
L-arabinose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D-arabinose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D-ribose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
L-ramnose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Etanol	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Glicerol	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Eritritol	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Ribitol	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Galactitol	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D-manitol	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D-glucitol	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Salicina	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Citrato	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
m-inositol	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Glicosamina	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Nitrato	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Glicose 50%	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Ciclo.100ppm	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+
Ciclo.1000ppm	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+
NaCl 10%	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Uréia	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D.B.B.	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Sínt. Amido	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
35 ^o C	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
40 ^o C	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
42 ^o C	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-

(continua)

*C= creme; *P="pink"; F.= fermentação de; Amido sol.= amido solúvel; Ciclo.= cicloheximida; Sínt. de amido= Síntese de amido.

Tabela 3 - Resultados das provas morfológicas, fisiológicas e de assimilação apresentados pelas leveduras (continuação).

Prova/Cultura	<i>Debaryomyces hansenii</i> var. <i>fabryii</i>									
	Q20 ₅	Q21 ₁	Q21 ₂	Q21 ₆	Q22 ₁	Q22 ₃	Q22 ₄	Q22 ₅	Q22 ₆	Q22 ₇
Pigmento	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C
Esporos	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
F. glicose	+	+	+	-	-	+	-	-	-	+
F. maltose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
F. sacarose	-	+	+	-	-	+	-	-	-	+
F. lactose	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
Glicose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Galactose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
L-sorbose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Maltose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Sacarose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Celobiose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Trealose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Lactose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Melibiose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Rafinose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Melezitose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Inulina	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Amido sol.	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D-xilose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
L-arabinose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D-arabinose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D-ribose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
L-ramnose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Etanol	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Glicerol	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Eritritol	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Ribitol	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Galactitol	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D-manitol	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D-glucitol	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Salicina	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Citrato	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
m-inositol	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Glicosamina	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Nitrato	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Glicose 50%	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Ciclo.100ppm	-	+	+	+	+	+	-	-	-	+
Ciclo.1000ppm	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
NaCl 10%	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Uréia	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D.B.B.	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Sínt. Amido	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
35 ^o C	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
40 ^o C	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
42 ^o C	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+

(continua)

*C= creme; *P="pink"; F.= fermentação de; Amido sol.= amido solúvel; Ciclo.= cicloheximida; Sínt. de amido= Síntese de amido.

Tabela 3 - Resultados das provas morfológicas, fisiológicas e de assimilação apresentados pelas leveduras (continuação).

Prova/Cultura	<i>Debayomyces hansenii</i> var. <i>fabryii</i>									
	Q22 ₈	Q22 ₉	Q22 ₁₀	Q23 ₁	Q23 ₂	Q23 ₃	Q23 ₄	Q23 ₅	Q24 ₁	Q24 ₄
Pigmento	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C
Esporos	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
F. glicose	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
F. maltose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
F. sacarose	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
F. lactose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Glicose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Galactose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
L-sorbose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Maltose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Sacarose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Celobiose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Trealose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Lactose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Melibiose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Rafinose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Melezitose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Inulina	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Amido sol.	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D-xilose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
L-arabinose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D-arabinose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D-ribose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
L-ramnose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Etanol	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Glicerol	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Eritritol	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Ribitol	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Galactitol	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D-manitol	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D-glucitol	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Salicina	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Citrato	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
m-inositol	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Glicosamina	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Nitrato	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Glicose 50%	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Ciclo.100ppm	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+
Ciclo.1000ppm	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
NaCl 10%	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Uréia	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D.B.B.	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Sínt. Amido	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
35 ^o C	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
40 ^o C	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
42 ^o C	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-

(continua)

*C= creme; *P="pink"; F.= fermentação de; Amido sol.= amido solúvel; Ciclo.= cicloheximida; Sínt. de amido= Síntese de amido.

Tabela 3 - Resultados das provas morfológicas, fisiológicas e de assimilação apresentados pelas leveduras (continuação).

Prova/Cultura	<i>Debaryomyces hansenii</i> var. <i>fabryii</i>									
	Q24 ₅	Q26 ₂	Q26 ₃	Q26 ₄	Q26 ₅	Q26 ₆	Q26 ₇	Q26 ₈	Q26 ₉	Q27 ₁
Pigmento	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C
Esporos	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
F. glicose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
F. maltose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
F. sacarose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
F. lactose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Glicose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Galactose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
L-sorbose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Maltose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Sacarose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Celobiose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Trealose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Lactose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Melibiose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Rafinose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Melezitose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Inulina	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Amido sol.	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D-xilose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
L-arabinose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D-arabinose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D-ribose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
L-ramnose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Etanol	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Glicerol	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Eritritol	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Ribitol	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Galactitol	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D-manitol	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D-glucitol	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Salicina	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Citrato	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
m-inositol	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Glicosamina	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Nitrato	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Glicose 50%	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Ciclo.100ppm	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Ciclo.1000ppm	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
NaCl 10%	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Uréia	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D.B.B.	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Sínt. Amido	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
35 ^o C	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
40 ^o C	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
42 ^o C	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+

(continua)

*C= creme; *P="pink"; F.= fermentação de; Amido sol.= amido solúvel; Ciclo.= cicloheximida; Sínt. de amido= Síntese de amido.

Tabela 3 - Resultados das provas morfológicas, fisiológicas e de assimilação apresentados pelas leveduras (continuação).

Prova/Cultura	<i>Debaryomyces hansenii</i> var. <i>fabryii</i>									
	Q27 ₄	Q27 ₅	Q27 ₆	Q27 ₇	Q27 ₈	Q29 ₄	Q29 ₆	Q29 ₈	Q29 ₉	Q30 ₁
Pigmento	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C
Esporos	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
F. glicose	+	-	+	-	-	+	+	-	+	-
F. maltose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
F. sacarose	-	-	+	-	-	+	+	-	-	-
F. lactose	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-
Glicose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Galactose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
L-sorbose	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+
Maltose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Sacarose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Celobiose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Trealose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Lactose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Melibiose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Rafinose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Melezitose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Inulina	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Amido sol.	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D-xilose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
L-arabinose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D-arabinose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D-ribose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
L-ramnose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Etanol	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Glicerol	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Eritritol	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Ribitol	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Galactitol	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D-manitol	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D-glucitol	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Salicina	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Citrato	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
m-inositol	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Glicosamina	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Nitrato	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Glicose 50%	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+
Ciclo.100ppm	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+
Ciclo.1000ppm	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+
NaCl 10%	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Uréia	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D.B.B.	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Sínt. Amido	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
35 ^o C	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
40 ^o C	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
42 ^o C	-	-	+	+	-	+	+	+	+	-

(continua)

*C= creme; *P="pink"; F.= fermentação de; Amido sol.= amido solúvel; Ciclo.= cicloheximida; Sínt. de amido= Síntese de amido.

Tabela 3 - Resultados das provas morfológicas, fisiológicas e de assimilação apresentados pelas leveduras (continuação).

Prova/Cultura	<i>Debaryomyces hansenii</i> var. <i>fabryii</i>					<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
	Q30 ₂	Q30 ₃	Q31 ₁	Q31 ₂	Q31 ₃	Q12 ₅
Pigmento	C	C	C	C	P	C
Esporos	+	+	+	+	+	-
F. glicose	-	-	-	-	+	-
F. maltose	-	-	-	-	-	-
F. sacarose	-	-	-	-	+	-
F. lactose	-	-	-	-	+	-
Glicose	+	+	+	+	+	+
Galactose	+	+	+	+	+	-
L-sorbose	+	+	+	+	+	-
Maltose	+	+	+	+	+	-
Sacarose	+	+	+	+	+	+
Celobiose	+	+	+	+	+	-
Trealose	+	+	+	+	+	-
Lactose	+	+	+	+	+	+
Melibiose	+	+	+	+	+	-
Rafinose	+	+	+	+	+	+
Melezitose	+	+	+	+	+	-
Inulina	+	+	+	+	+	-
Amido sol.	+	+	+	+	+	-
D-xilose	+	+	+	+	+	-
L-arabinose	+	+	+	+	+	-
D-arabinose	+	+	+	+	+	-
D-ribose	+	+	+	+	+	-
L-ramnose	+	+	+	+	+	-
Etanol	+	+	+	+	+	-
Glicerol	+	+	+	+	+	-
Eritritol	+	+	+	+	+	-
Ribitol	+	+	+	+	+	-
Galactitol	+	+	+	+	+	-
D-manitol	+	+	+	+	+	-
D-glucitol	+	+	+	+	+	-
Salicina	+	+	+	+	+	-
Citrato	+	+	+	+	+	-
m-inositol	+	+	+	+	+	-
Glicosamina	+	+	+	+	+	-
Nitrato	+	+	+	+	+	-
Glicose 50%	+	+	+	+	+	-
Ciclo.100ppm	-	-	-	+	+	-
Ciclo.1000ppm	-	-	-	+	-	-
NaCl 10%	+	+	+	+	+	-
Uréia	-	-	-	-	-	-
D.B.B.	-	-	-	-	-	-
Sínt. Amido	-	-	-	-	-	-
35 ^o C	+	+	+	+	+	+
40 ^o C	+	+	+	+	+	+
42 ^o C	+	+	+	-	+	+

*C= creme; *P="pink"; F.= fermentação de; Amido sol.= amido solúvel; Ciclo.= cicloheximida; Sínt. de amido= Síntese de amido.

5.3. Resistência aos principais conservantes alimentícios permitidos na legislação vigente

No Brasil, os conservantes são definidos pela legislação como “substâncias que impedem ou retardam a alteração dos alimentos provocada por microrganismos ou enzimas” (Brasil, 1997). A referida lei permite o uso de diferentes conservadores em alimentos, sendo que entre os mais utilizados estão os benzoatos e os sorbatos (Tfouni & Toledo, 2001).

Todas as cento e cinqüenta e cinco leveduras isoladas foram sensíveis aos dois conservantes alimentícios testados “in vitro”, isto é, benzoato de sódio e sorbato de potássio nas seguintes concentrações: 0,1; 0,2 e 0,4% para o primeiro e 0,05; 0,1; 0,2 e 0,4% para o segundo.

O ácido benzóico é um dos conservadores mais empregados nas indústrias tanto farmacêuticas como alimentícias, apresentando atividade contra bolores, leveduras e bactérias, sendo mais eficiente contra bactérias e leveduras, podendo ser utilizado puro ou como sais de sódio, cálcio ou potássio (Sofos, 1995).

O ácido sórbico como conservador de alimentos é bastante usado em todo o mundo, podendo ser empregado puro ou como sais de sódio, cálcio ou potássio. Os sorbatos são mais eficazes principalmente contra bolores e leveduras, embora atuem também sobre uma variedade ampla de bactérias (Jay, 1996).

Observou-se que os conservantes benzoato de sódio e sorbato de potássio, nas mesmas concentrações testadas neste trabalho, apresentaram, resultados similares aos obtidos por Silva et al. (2002).

Em um estudo desenvolvido por Neves, Pampulha & Loureiro-Dias (1994), a concentração de 0,05% de sorbato de potássio foi eficaz em 80,0% das seguintes leveduras testadas: *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomycodes ludwigii* e *Zygosaccharomyces bailii*.

A inibição pelo benzoato de sódio e sorbato de potássio na concentração de 0,2% foi similar aquela obtida por Coelho, (2001) e Mansor, (2001). A de benzoato de sódio a 0,1% e sorbato de potássio em 0,05 e 0,1% foi similar a de Mansor, (2001) e superior a de Coelho, (2001).

Apesar dos resultados demonstrarem a sensibilidade de todas estas leveduras aos conservantes alimentícios empregados, acredita-se que com os devidos cuidados nas diversas etapas de processamento, incluindo-se a seleção das matérias-primas, e por meio de procedimentos adequados de limpeza e desinfecção, podem-se sanar os principais problemas de deterioração e/ou patogenicidade de produtos derivados de leite.

5.4. Sensibilidade a um tratamento térmico (63°C/30 min.)

A escolha de tempo e temperatura a serem usados neste tratamento que envolve um produto alimentício dependerá do efeito que o calor exerça sobre o mesmo.

Temperaturas elevadas causam a desnaturação de proteínas e a inativação de enzimas necessárias ao metabolismo microbiano.

Para Franco & Landgraf (1996), a pasteurização pode ter duas finalidades distintas: destruição de todos os microrganismos causadores de doenças (por exemplo, a do leite) ou destruição / redução do número de microrganismos deteriorantes (por exemplo, a do vinagre e de sucos). Este processo é aplicado a alimentos ácidos ou muito ácidos (pH < 4,5), aos que são conservados sob refrigeração ou congelamento e ainda aqueles submetidos a concentração e desidratação. Conseqüentemente, não haverá condições para a multiplicação das formas microbianas que resistem à pasteurização.

Em relação ao leite, a pasteurização pode ser atingida sob diferentes combinações de tempo / temperatura. As mais comuns são baixa temperatura / longo tempo (63°C / 30 minutos) e alta temperatura / tempo curto (72°C / 15 segundos).

Conforme os resultados encontrados na Tabela 4 verificou-se que das cento e cinquenta e cinco leveduras isoladas

(100,00%), apenas vinte e uma (13,55%), foram resistentes ao tratamento térmico aplicado, sendo que oito estão representadas por *Candida edax* (Q3₁, Q5₁, Q5₂, Q15₃, Q19₉, Q24₃, Q29₅ e Q31₄), uma por *Cryptococcus albidus* (Q3₂), duas por *Cryptococcus laurentii* (Q1₁ e Q12₁) e dez por *Debaryomyces hansenii* var. *fabryii* (Q13₄, Q13₉, Q15₂, Q18₁, Q18₈, Q29₆, Q30₁, Q30₂, Q31₁ e Q31₃). As cento e trinta e quatro (86,45%) restantes sensíveis ao tratamento térmico estão apresentadas na Tabela 5.

Algumas leveduras de mesma espécie, apresentaram comportamento diferente com relação ao tratamento térmico, considerando que estas também diferiram em uma ou mais características das culturas padrão.

Relacionando o comportamento das vinte e uma leveduras resistentes a um tratamento térmico, com os conservantes alimentícios testados, verificou-se que as culturas de *Candida edax*, *Cryptococcus albidus*, *Cryptococcus laurentii* e *Debaryomyces hansenii* var. *fabryii* foram sensíveis ao benzoato de sódio e sorbato de potássio, principalmente, em suas menores concentrações, ou seja, 0,1 e 0,05% respectivamente. Somente a *Saccharomyces cerevisiae* foi sensível para ambos os testes.

Tabela 4 - Frequência relativa dos quatro gêneros de leveduras resistentes ao tratamento térmico 63^oC por 30 minutos.

Leveduras	Código das culturas	Porcentagem (n=21)
<i>Candida edax</i>	Q3 ₁ , Q5 ₁ , Q5 ₂ , Q15 ₃ , Q19 ₉ , Q24 ₃ , Q29 ₅ e Q31 ₄	38,10%
<i>Cryptococcus albidus</i>	Q3 ₂	4,76%
<i>Cryptococcus laurentii</i>	Q1 ₁ , e Q12 ₁	9,52%
<i>Debaryomyces hansenii</i> var. <i>fabryii</i>	Q13 ₄ , Q13 ₉ , Q15 ₂ , Q18 ₁ , Q18 ₈ , Q29 ₆ , Q30 ₁ , Q30 ₃ , Q31 ₁ e Q31 ₃	47,62%

Tabela 5 - Frequência dos quatro gêneros de leveduras sensíveis ao tratamento térmico 63⁰C por 30 minutos.

Leveduras	Código das culturas	Porcentagem (n=134)
<i>Candida edax</i>	Q1 ₄ , Q2 ₈ , Q2 ₁₁ , Q2 ₁₂ , Q3 ₅ , Q3 ₆ , Q3 ₈ , Q4 ₁ , Q6 ₃ , Q6 ₇ , Q7 ₁ , Q7 ₂ , Q7 ₄ , Q8 ₁ , Q8 ₂ , Q9 ₂ , Q10 ₁ , Q10 ₂ , Q12 ₄ , Q13 ₅ , Q13 ₇ , Q13 ₈ , Q14 ₅ , Q15 ₁ , Q17 ₄ , Q18 ₉ , Q19 ₁ , Q19 ₄ , Q19 ₅ , Q19 ₆ , Q19 ₇ , Q19 ₈ , Q20 ₂ , Q20 ₃ , Q21 ₃ , Q21 ₄ , Q21 ₅ , Q22 ₂ , Q23 ₆ , Q24 ₂ , Q24 ₆ , Q26 ₁ , Q27 ₂ , Q27 ₃ , Q27 ₉ , Q27 ₁₀ , Q29 ₁ , Q29 ₂ , Q29 ₃ , Q29 ₇ e Q29 ₁₀	38,06%
<i>Cryptococcus albidus</i>	Q16 ₁ e Q24 ₇	1,49%
<i>Cryptococcus laurentii</i>	Q2 ₁₃ , Q13 ₃ , Q13 ₆ , Q14 ₂ e Q18 ₄	3,73%
<i>Debaryomyces hansenii</i> var. <i>fabryii</i>	Q2 ₂ , Q2 ₄ , Q2 ₅ , Q2 ₇ , Q7 ₃ , Q8 ₃ , Q8 ₄ , Q9 ₃ , Q9 ₄ , Q11 ₁ , Q12 ₃ , Q13 ₁ , Q13 ₂ , Q14 ₁ , Q14 ₃ , Q14 ₄ , Q14 ₆ , Q14 ₇ , Q14 ₈ , Q14 ₉ , Q14 ₁₀ , Q16 ₃ , Q17 ₁ , Q17 ₃ , Q18 ₂ , Q18 ₃ , Q18 ₅ , Q18 ₆ , Q18 ₇ , Q18 ₁₀ , Q18 ₁₁ , Q19 ₂ , Q19 ₃ , Q20 ₁ , Q20 ₄ , Q20 ₅ , Q21 ₁ , Q21 ₂ , Q21 ₆ , Q22 ₁ , Q22 ₃ , Q22 ₄ , Q22 ₅ , Q22 ₆ , Q22 ₇ , Q22 ₈ , Q22 ₉ , Q22 ₁₀ , Q23 ₁ , Q23 ₂ , Q23 ₃ , Q23 ₄ , Q23 ₅ , Q24 ₁ , Q24 ₄ , Q24 ₅ , Q26 ₂ , Q26 ₃ , Q26 ₄ , Q26 ₅ , Q26 ₆ , Q26 ₇ , Q26 ₈ , Q26 ₉ , Q27 ₁ , Q27 ₄ , Q27 ₅ , Q27 ₆ , Q27 ₇ , Q27 ₈ , Q29 ₄ , Q29 ₈ , Q29 ₉ , Q30 ₂ e Q31 ₂	55,97%
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Q12 ₅	0,75%

6. CONCLUSÕES

Das trinta e uma amostras de queijo tipo “Minas Frescal” analisadas (100,00%), trinta (96,80%) apresentaram-se em desacordo com um ou mais padrões da legislação brasileira, sendo trinta (96,80%) para *Staphylococcus aureus*, doze (38,70%) para *Salmonella sp* e doze (38,70%) para *Staphylococcus aureus* e *Salmonella sp* e então consideradas “impróprias para o consumo humano”;

As culturas de leveduras isoladas pertencem, especificamente, a *Candida edax* (38,06%), *Cryptococcus albidus* (1,94%), *Cryptococcus laurentii* (4,52%), *Debaryomyces hansenii* var. *fabryii* (54,84%) e *Saccharomyces cerevisiae* (0,64%);

Todas as espécies identificadas foram sensíveis aos dois conservantes alimentícios testados, isto é, benzoato de sódio nas concentrações de 0,1; 0,2 e 0,4% e sorbato de potássio a 0,05; 0,1; 0,2 e 0,4%;

Para a sensibilidade ao tratamento térmico de 63°C por 30 minutos apenas vinte e uma (13,55%) das leveduras foram resistentes; e

As leveduras identificadas frente aos conservantes alimentícios testados, mesmo em suas menores concentrações, apresentaram maior sensibilidade que ao tratamento térmico de 63°C por 30 minutos.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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. **Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 16, n. 102/103, p. 71-73, nov./dez., 2002.

ALMEIDA FILHO, E. S.; NADER FILHO, A. Ocorrência de *Staphylococcus aureus* em queijo tipo “frescal”. **Revista de Saúde Pública**, v. 34, n. 6, p. 578-580, dez., 2000.

AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION (APHA). **Métodos recomendados para o exame microbiológico de alimentos**. São Paulo, Polígono, p. 173-211, 1972.

AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION (APHA). **Compendium of methods for the microbiological examination of foods**. 2. ed., Washington, D. C., 325p., 1976.

AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION (APHA). **Compendium of methods for the microbiological examination of foods**. 2 ed., Washington, D. C., 914 p., 1984.

AZADIAN, B. S.; FINNERTY, G. T.; PEARSON, A. D. Cheese-borne *Listeria meningitis* in immunocompetent patient. **Lancet**, v. 1, n. 8633, p. 322-323, 1989.

BARNETT, J. A.; PAYNE, R. W.; YARROW, D. Yeasts: characteristics and identification. **Cambridge, Cambridge University Press, 881 p., 1983.**

BARNETT, J. A.; PAYNE, R. W.; YARROW, D. **Yeasts: characteristics and identification**. 2 ed., Cambridge, Cambridge University Press, 1002 p., 1990.

BARROS, V. R. M.; PAIVA, P. C.; PANETTA, J. C. *Salmonella spp*: sua transmissão através dos alimentos. *Higiene Alimentar*, São Paulo, v. 16, n. 91, p. 15-19, mai., 2002.

BEHMER, M. L. A. **Tecnologia do leite**. 13a. ed., São Paulo, Nobel, p. 155-156, 1984.

BOER, E.; KUIK, D. A survey of dairy product quality of blue-veined cheese. **Netherlands Milk & Dairy Journal**, v. 41, p. 227-237, 1987.

BORELLI, B. M.; LACERDA, I. C. A.; FERREIRA, E. G.; DIAS, R. S.; CARMO, L. S.; SANTOS, D. A.; ROSA, C. A. Perfil microbiológico do queijo Minas curado produzido na região da Serra da Canastra-MG. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS, XVII., Fortaleza-CE, 2000, p. 4.91.

BRASIL. Ministério da Agricultura. Secretaria Nacional de Defesa Agropecuária. **Métodos analíticos oficiais para o controle de produtos de origem animal e seus ingredientes. I. Métodos microbiológicos**. Brasília, 1981.

BRASIL. Leis, decretos, etc. Portaria n. 451 de 19 de setembro de 1997. Aprova o regulamento técnico e princípios gerais para o estabelecimento de critérios e padrões microbiológicos para alimentos e seus anexos I, II e

II. **Diário Oficial da União**, Brasília-DF, ano CXXXV, n. 182, seção 1, p. 21005-21012, 22 de setembro de 1997.

BRASIL. Ministério da Agricultura e do Abastecimento. Portaria n. 352, de 4 de setembro de 1997. Aprova o Regulamento Técnico para Fixação de Identidade e Qualidade de Queijo Minas Frescal.

BRASIL. Portaria n. 540 - SVS, 28 de outubro de 1997. **Diário Oficial da União**, Brasília, n. 208.

BRASIL. Leis, decretos, etc. Resolução RDC n. 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.

CÂMARA, S. A. V.; AMARAL, G. B.; MULLER, M. T.; SILVEIRA, K. C. S.; ALMEIDA, T. N.; MEDEIRO, C. F. Avaliação microbiológica de queijos tipo Minas Frescal artesanal, comercializados no mercado municipal de Campo Grande, Mato Grosso do Sul, 2000. **Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 16, n. 101, p. 32-36, out., 2002.

CATÃO, R. M. R.; CEBALLOS, B. S. O. *Listeria spp.*, coliformes totais e fecais e *E. coli* no leite cru e pasteurizado de uma indústria de laticínios, no Estado da Paraíba-Brasil. **Ciência e Tecnologia dos Alimentos**, Campinas, v. 21, n. 3, p. 281-287, dez., 2001.

COELHO, A. R. **Qualidade microbiológica e ocorrência de leveduras em diferentes tipos de sorvetes**. São José do Rio Preto, 2001. 106p. Dissertação (Mestre em Engenharia e Ciência de Alimentos), Instituto de

Biociências, Letras e Ciências Exatas, Universidade Estadual Paulista (UNESP).

CORBIA, A. C. G.; NASCIMENTO, M. G. F.; NASCIMENTO, E. R.; OLIVEIRA, C. Z. F.; LIGNON, G. B. Estudo comparativo entre meios de Baird-Parker e Vogel-Johnson no isolamento de *Staphylococcus spp.* de queijos. **Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 13, n. 61, p. 30, abr./mai., 1999.

CUNHA, C. P.; NASCIMENTO, M. G. F.; JESUS, V. L. T.; NASCIMENTO, E. R.; CORBIA, A. C. G. Queijo tipo Minas Frescal com e sem serviço de inspeção federal-contaminação por coliformes fecais e *Escherichia coli*. **Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 13, n. 61, p. 34-35, abr./mai., 1999.

DAVIDSON, P. M.; BRANDEN, A. L. Antimicrobial activity of non-halogenated phenolic compounds. **Journal of Food Protection**, v. 44, n. 8, p. 623-632, 1981.

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

ENGEL, G. Yeasts in silage and raw milk. **Milchwissenschaft**, v. 41, p. 633-637, 1986.

FARIA, L. M.; FONSECA, L. M.; CABRAL, M. C.; FERREIRA, C. L. L. F.; MACHADO, E. C. Avaliação microbiológica de queijo minas artesanal fresco e maturado produzido na região do Serro-MG. **Revista do Instituto**

de Laticínios “Cândido Tostes”, Juiz de Fora, v. 57, n. 327, p. 66-70, jul./ago., 2002.

FEITOSA, T. Aspecto higiênico e sanitário do queijo tipo “coalho” do estado do Ceará. **Ciência Agrônômica**, Fortaleza, v. 16, n. 2, p. 27-32, dez., 1985.

FLEET, G. H.; MIAN, M. A. The occurrence and growth of yeasts in dairy products. **International Journal of Food Microbiology**, v. 4, p. 145-155, 1987.

FLEET, G. H. Yeasts in dairy products. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 68, n. 3, p. 199-211, 1990.

FLEMING, D. W. Pasteurized milk as a vehicle of infection in a outbreak of listeriosis. **New England Journal of Medicine**, v. 312, n. 7, p. 404-407, 1985.

FLORENTINO, E. R.; MARTINS, R. S. Características microbiológicas do “queijo de coalho” produzido no estado da Paraíba. **Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 13, n. 59, p. 43-48, jan./fev., 1999.

FRANCO, B. D. G. M.; LANDGRAF, M. **Microbiologia dos alimentos**. [S.l.]: Atheneu, 1996, 187 p.

FRASER, J. A.; SPERBER, W. H. Rapid detection of *Listeria spp.* in food and environmental samples by aesculin hydrolysis. **Journal of Food Protection**, v. 51, p. 762-765, 1988.

FURLANETTO, S. M. P.; SANTOS, M. A. A.; HARA, C. *Listeria spp*: Avaliação da eficiência de quatro meios de plaqueamento no seu isolamento. **Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 10, n. 46, p. 30-34, nov./dez., 1996.

FURTADO, M. M. Queijo do Serro: tradição na história do povo mineiro. **Revista do Instituto de Laticínios “Cândido Tostes”**, Juiz de Fora, v. 35, p. 33-36, 1980.

GARCIA-CRUZ, C. H.; HOFFMANN, F. L.; VINTURIM, T. M. Estudo microbiológico de queijo tipo Minas-Frescal de produção artesanal, comercializado na cidade de São José do Rio Preto-SP. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, São Paulo, v. 54, n. 2, p. 78-82, jun./dez., 1994.

GERMANO, P. M. L.; GERMANO, M. I. S. Higiene do leite: aspectos gerais das mastites. **Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 9, n. 36, p. 12-16, mar./abr., 1995.

GUERREIRO, M. G. **Bacteriologia especial com interesse à saúde pública**. Porto Alegre, Sulina, 1984.

GURGEL, M. S. C. C. A.; SPOTO, M. H. F.; DOMARCO, R. E.; GUTIERREZ, E. M. R. Aceitação pelo consumidor do queijo Minas frescal. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS, XVII., Fortaleza-CE, 2000, p. 3.29.

HAGLER, A. N.; MENDONÇA-HAGLER, L. C. A diazonium blue B test for yeasts grown three days on yeast carbon base urea agar. **Revista de Microbiologia**, São Paulo, v. 22, n. 1, p. 71-74, jan./mar., 1991.

HARRIGAN, W. F.; MC CANCE, M. E. **Laboratory Methods in Food Dairy Microbiology**. Academic Press, New York, London-San Francisco, 1976, 353 p.

HOFFMANN, F. L.; GARCIA-CRUZ, C. H.; VINTURIM, T. M. Avaliação das características microbiológicas do leite tipo “C” vendido na região de São José do Rio Preto-SP. **Boletim do CEPPA**, Curitiba, v. 12, n. 1, p. 17-24, jan./jun., 1994a.

HOFFMANN, F. L.; GARCIA-CRUZ, C. H.; VINTURIM, T. M.; POSSEBON, A. Qualidade microbiológica de queijo tipo “Minas Frescal” e queijos condimentados comercializados na região de São José do Rio Preto-SP. In: CONGRESSO NACIONAL DE LATICÍNIOS, XII., Juiz de Fora-MG, 1994b, p. 61-65.

HOFFMANN, F. L.; SILVA, J. V.; VINTURIM, T. M. Qualidade microbiológica de queijos tipo “Minas Frescal”, vendidos em feiras livres na região de São José do Rio Preto-SP. **Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 16, n. 96, p. 69-76, mai., 2002.

INTERNATIONAL COMMISSION ON MICROBIOLOGICAL SPECIFICATIONS FOR FOODS (ICMSF). **Microorganisms in foods: 2. Sampling for microbiological analysis: principles and specific application**. University of Toronto Press, 1974, 213 p.

INTERNATIONAL COMMISSION ON MICROBIOLOGICAL SPECIFICATIONS FOR FOODS (ICMSF). **Microorganisms in foods: their significance and methods of enumeration**. 2. ed. Toronto, University of Toronto Press, 1978. v. 1, 434 p.

INTERNATIONAL COMMISSION ON MICROBIOLOGICAL SPECIFICATIONS FOR FOODS (ICMSF). **Microbial ecology of foods**. New York, Academic Press, 1980, v. 2, 997 p.

JAY, J. M. **Modern food microbiology**. 5. ed. Chapman & Hall, New York, 1996.

JAY, J. M. **Modern food microbiology**. 6. ed. Maryland: Aspen, 2000, 679 p.

JUNIOR, V. E. Algumas considerações sobre o mercado de queijos no Brasil. **Informe Agropecuário**, v. 10, n. 115, p. 3-6, 1984.

KREEGER VAN RIJ, N. J. W. **The yeasts: a taxonomy study**. Amsterdam, Elsevier Science Publication, 1984, 1082 p.

KURTZMAN, C. P.; FELL, J. W. **The yeasts: a taxonomic study**. 4 ed. [S. I.]: Elsevier, 1998, 1055 p.

LAICINI, Z. M.; PARMEZZANI, A. F.; PAULA, S. R.; CARLUCCI, N. T. Avaliação dos laudos analíticos das amostras de alguns tipos de queijos recebidos pelo Instituto Adolfo Lutz de Ribeirão Preto. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, São Paulo, v. 53, n. 1/2, p. 17-20, jan./dez., 1993.

LANGONI, H.; FONSECA, T. H. P. Participação da *Listeria monocytogenes* na mastite bovina: Importância para a saúde pública. **Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 11, n. 50, jul./ago., 1997.

LEDERBERG, J.; LEDERBERG, E. M. Replica plating and indirect selection of bacterial mutants. **Journal of Bacteriology**, v. 63, p. 399-406, 1952.

LEITE JUNIOR, A. F. S.; FLORENTINO, E. R.; OLIVEIRA, E. B.; SÁ, S. N.; TORRANO, A. D. M. Qualidade microbiológica do queijo de coalho comercializado à temperatura ambiente ou sob refrigeração, em Campina Grande-PB. **Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 14, n. 73, p. 53-59, jun., 2000.

LINNAN, L. J. Epidemic listeriosis associated with Mexican-style cheese. **New England of Journal Medicine.**, v. 319, n. 13, p. 823-828, 1988.

MANSOR, A. P. **Qualidade microbiológica e ocorrência de leveduras em diferentes tipos de manteiga.** São José do Rio Preto, 2001. 120 p. Dissertação (Mestre em Engenharia e Ciência de Alimentos), Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, Universidade Estadual Paulista (UNESP).

MARTH, E. E. **Standard methods for the examination of dairy products.** 14 ed. Washington, APHA, 1978, 416 p.

MARTINEZ, E. B.; TESONE, S.; QUEVEDO, F. Survey of the microbiological quality of adult bovine rennet extracts. **Journal of Food Protection**, v. 49, p. 507-509, 1986.

MARTINS, E. Patrimônio de Minas. **Revista Economia do Jornal Estado de Minas, Minas Gerais**, n. 44, p. 14-17, dez., 2001.

McCLAIN, D.; LEE, W. H. FHIS Method for the isolation and identification of *Listeria monocytogenes* from processed meat and poultry products. Laboratory Communication n. 57 revised May 24, 1989. U.S. Department of Agriculture-Food Safety and Inspection Service, Betsville.

MENDES, E. S.; NUMERIANO, A. K. M.; COELHO, M. I. S. *Staphylococcus aureus*, *Salmonella sp.* e coliformes em queijos de “coalho” comercializados em Recife. **Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 13, n. 66/67, p. 122, nov./dez., 1999.

MOSSEL, D. A. A.; GARCIA, B. M. **Microbiologia de los alimentos- fundamentos ecológicos para garantizar y comprobar la inocuidad y la calidad de los alimentos**. Zaragoza, Editorial Acribia, S. A, p. 10-14, 1984.

NAKASE, T.; KOMAGATA, K. Microbiological studies on cheese. I. Yeast flora in cheese imported from Europa and North America. **Journal of the Food Hygienic Society of Japan**, v. 18, p. 346-352, 1977.

NASCIMENTO, D.; SABIONE, J. G.; PIMENTA, N. Frequência de *Escherichia coli* enteropatogênica clássica (EPEC) e enteroinvasora (EIEC) em queijos tipo Minas Frescal da cidade de Ouro Preto-MG. **Revista de Microbiologia**, São Paulo, v. 19, n. 3, p. 258-261, jul./set., 1988.

NASCIMENTO, F. R. R.; QUEIROZ, E. L.; ARCANJO, S. R. S.; ARAÚJO, R. E. S. Ações da vigilância sanitária perante as condições higiênico-sanitárias do queijo de coalho comercializado no município de Fortaleza.

Revista do Instituto de Laticínios “Cândido Tostes”, v. 56, n. 321, p. 257-261, jul./ago., 2001.

NASCIMENTO, M. G. F.; CORBIA, A. C. G.; NASCIMENTO, E. R.; CUNHA, C. P. Avaliação e controle higiênico-sanitário de uma queijaria de produção artesanal de queijo Minas Frescal. **Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 13, n. 61, p. 31, abr./mai., 1999.

NEVES, L.; PAMPULHA, M. E.; LOUREIRO-DIAS, M. C. Resistance of food spoilage yeasts to sorbic acid. **Letters in Applied Microbiology**, v. 19, n. 1, p. 8-11, jul., 1994.

NICOLAU, E. S.; KUAYE, A. Y.; MESQUITA, A. J. Avaliação do potencial de produção e tipos de enterotoxinas estafilocócicas encontradas em linhagens de *Staphylococcus aureus* em extratos de amostras de queijo tipo muzzarella fabricado na região de Goiânia-GO. **Revista do Instituto de Laticínios “Cândido Tostes”**, Juiz de Fora, v. 56, n. 321, p. 92-101, jul./ago., 2001.

NOOITGEDAGT, A. J.; HARTOG, J. B. A survey of the microbiological quality of Brie and Camembert cheese. **Netherlands Milk & Dairy Journal**, v. 42, p. 57-72, 1988.

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

OLIVEIRA, C. Z. F.; CORBIA, A. C. G.; NASCIMENTO, M. G. F.; LIGNON, G. B.; SILVA, R. V. M. A. Susceptibilidade antimicrobiana, "in vitro", de bactérias do gênero *Staphylococcus*, isoladas de queijos Minas. **Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 13, n. 61, p. 30, abr./mai., 1999.

PAIVA, M. S. D.; CARDONHA, A. M. S. Queijo de coalho artesanal e industrializado produzido no Rio Grande do Norte: Estudo comparativo da qualidade microbiológica. **Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 13, n. 61, p. 33, abr./mai., 1999.

PEDRO, S. C. M.; GERMANO, P. M. L.; MATTÉ, M. H. Pesquisa de contaminação fecal, contagem de mesófilos, psicrófilos e bolores/leveduras em amostras de queijo Minas comercializados por ambulantes nas ruas de São Paulo. **Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 15, n. 80/81, p. 99, jan./fev., 2001.

PERESI, J. T. M.; GRACIANO, R. A. S.; ALMEIDA, I. A. Z. C.; LIMA, S. I.; RIBEIRO, A. K.; CARVALHO, I. S.; LIMA, M. Queijo Minas Frescal artesanal e industrial: qualidade microscópica, microbiológica e teste de sensibilidade aos agentes antimicrobianos. **Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 15, n. 83, p. 63-70, abr., 2001.

PINTO, P. S. A.; GERMANO, M. I. S.; GERMANO, P. M. L. Queijo Minas: problema emergente da vigilância sanitária. **Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 10, n. 44, p. 22-27, jul./ago., 1996.

RABELO, J. A.; MOULIN, M. R. I.; SQUILASSI, K. M. B. S.; SOUZA, W. M.; VIEIRA, M. C. M.; SOUZA, C. M. Qualidade microbiológica de queijo Minas Frescal comercializado no estado de Goiás no período de junho a

dezembro de 1999. **Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 15, n. 80/81, p.119, jan./fev., 2001.

RAPINI, S. L.; FEIJÓ, L. D.; VERAS, J. F.; NASCIMENTO, K. F.; AMADO, J. B.; COUTO, I. P.; CARMO, L. S.; SILVA, M. C. C.; CERQUEIRA, M. M. O. P. Pesquisa de *Salmonella sp*, *Escherichia coli*, *Listeria sp* e *Staphylococcus sp* e detecção de enterotoxinas estafilocócicas em queijos tipo coalho. **Revista do Instituto de Laticínios “Cândido Tostes”**, Juiz de Fora, v. 57, n. 327, p. 60-65, jul./ ago., 2002.

REIBNITZ, M. G. R.; TAVARES, L. B. B. Isolamento de *Staphylococcus aureus* coagulase e DN'ase positivos a partir de queijo colonial comercializado em Blumenau. **Boletim do CEPPA**, Curitiba, v. 13, n. 1, p. 1-6, jan./jun., 1995.

RITTER, R.; SANTOS, D.; BERGMANN, G. P. Análise da qualidade microbiológica de queijo colonial, não pasteurizado, produzido e comercializado por pequenos produtores, no Rio Grande do Sul. **Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 15, n. 87, p. 51-55, ago., 2001.

RODRIGUES, F. T.; VIEIRA, M. D.; SANTOS, J. L. Características microbiológicas de queijos tipo Minas Frescal comercializados em Viçosa-MG., **Revista do Instituto de Laticínios “Cândido Tostes”**, Juiz de Fora, n. 324, p. 233-235, jul./ago., 1995.

SÁ BARRETO, E. S.; PEREIRA, C. R. P. Avaliação da qualidade das marcas de queijo minas tipo frescal consumidas no município do Rio de Janeiro. **Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 13, n. 61, p. 53, abr./mai., 1999.

SABIONI, J. G.; NASCIMENTO, D.; PEREIRA, J. L. Intoxicação estafilocócica causada por queijo tipo Minas em Ouro Preto (MG), 1992.

Higiene Alimentar, São Paulo, v. 8, n. 33, p. 22-23, set., 1994.

SANTOS, E. C. Fabriqueta artesanal de laticínios. **Informe Agropecuário**, v. 8, n. 88, p. 26-28, 1982.

SANTOS, F. A.; NOGUEIRA, N. A. P.; CUNHA, G. M. A. Aspectos microbiológicos do queijo tipo “Coalho” comercializado em Fortaleza-Ceará. **Boletim do CEPPA**, Curitiba, v. 13, n. 1, p. 31-36, jan./jun., 1995.

SENA, M. J.; CERQUEIRA, M. M. O. P.; SANTOS, D. A.; LEOCARDIO FILHO, G.; DIAS, R. S. Salmonelas isoladas de queijos tipo “coalho”: caracterização sorológica e resistência a agentes antimicrobianos Recife-PE. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v. 58, n. 1, p. 13-17, jan./jun., 1999.

SERAFINI, A. B.; CAIXETA, E. R.; BARBOSA, A. J.; VIEIRA, J. D. G. Isolamento de *Listeria spp.* de amostras de águas residuais de quatro indústrias de laticínios, localizadas nas cidades de Goiânia e Anápolis, Goiás. **Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 10, n. 46, p. 48-50, nov./dez., 1996.

SHEREE LIN, C. C.; FUNG, D. Y. C.; COX, N. A. Conventional and rapid methods for yeast identification. **Critical Reviews in Microbiology**, v. 14, n. 4, p. 273-289, 1987.

SILVA, J. V.; HOFFMANN, F. L.; MANSOR, A. P.; COELHO, A. R.; VINTURIM, T. M. Monitoramento da qualidade microbiológica de queijos

tipo “Minas Frescal” fabricados artesanalmente. **Indústria de Laticínios**, São Paulo, ano 6, n. 34, p. 71-75, jul./ago., 2001.

SILVA, J. V.; HOFFMANN, F. L.; PENNA, A. L. B.; GARCIA-CRUZ, C. H. Atividade antimicrobiana “in vitro” de dois conservantes alimentícios. In: XVIII CONGRESSO BRASILEIRO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS, Porto Alegre-RS, 2002.

SILVA, M. C. C.; CASTRO, D. G. Ocorrência de surto de toxinfecção alimentar causada por queijo tipo “Minas”. In: CONGRESSO NACIONAL DE LATICÍNIOS, XIII., Juiz de Fora-MG, 1995, p. 144-145.

SILVA, M. C. D.; TIBANA, A. *Listeria monocytogenes* em alimentos; seu significado nos dias atuais. **Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 9, n. 38, p. 7-10, jul./ago., 1995.

SOFOS, J. N. Antimicrobial agents. In: MAGA, J. A. & TU, A. T. (Eds.) **Food Additive Toxicology**, New York: Marcel Dekker Inc., 1995, cap. 11, p. 501-529.

SOUZA, R. M.; RANGEL, F. F.; PENNA, C. F. A. M.; CERQUEIRA, M. M. P.; SOUZA, M. R. Avaliação de características físico-químicas e microbiológicas de queijo Minas Frescal light comercializado em Belo Horizonte-MG. **Revista do Instituto de Laticínios “Cândido Tostes”**, Juiz de Fora, v. 57, n. 327, p. 289-290, jul./ago., 2002.

SPECK, M. L. **Compendium of methods for the microbiological examination of foods**. APHA, 1976, 702 p.

TANIWAKI, M. H.; VAN DENDER, A. G. F. Bolores produtores de toxinas em queijos: ocorrência e significado. **Coletânea do ITAL**, Campinas, v. 21, n. 2, p. 187-200, jul./dez., 1991.

TAVARES, L. B. B.; GARCIA, J. A. Ocorrência de coliformes fecais e *Escherichia coli* em queijo colonial comercializado no município de Blumenau, Estado de Santa Catarina. **Boletim do CEPPA**, Curitiba, v. 11, n. 2, p. 139-146, jul./dez., 1993.

TESSARI, E. N. C.; CARDOSO, A. L. S. P. Qualidade microbiológica do leite tipo "A" pasteurizado, comercializado na cidade de Descalvado-SP. **Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 16, n. 96, p. 65-68, mai., 2002.

TFOUNI, S. A. V.; TOLEDO, M. C. F. Conservadores ácido benzóico e ácido sórbico: uma revisão. **Boletim da Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 35, n. 1/2, p. 41-53, jan./dez., 2001.

TINÔCO, A. L. A.; COELHO, M. S. L.; PINTO, P. S. A.; NOVATO, M. R. R.; BEZ, F.; BARCELLOS, R. M. C. Estudo microbiológico comparativo de leites pasteurizados em estabelecimentos com inspeção federal e em fazendas. **Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 16, n. 96, p. 88-93, mai., 2002.

VAN NETTER, P.; PERALIS, I.; MOOSDIJK, A.; VAN DE CURTIS, G. D. W.; MOSSEL, D. A. A. Liquid and solid selective differential media for the detection of *Listeria monocytogenes* and other *Listeria spp.* **International Journal of Food Microbiology**, v. 9, p. 299-316, 1989.

VARGAS, O. L.; PORTO, M. A. C.; BRITO, A. L. Características de origens para queijos naturais de Minas Gerais: Municípios do Serro e de São Roque de Minas. **Revista do Instituto de Laticínios “Cândido Tostes”**, Juiz de Fora, v. 53, n. 301, 302 e 303, p. 19-49, jan./jun., 1998.

VESSONI PENNA, T. C.; BARUFFALDI, R.; COLOMBO, A. J. Estudo das condições higiênico-sanitárias e das características físico-químicas do leite pasteurizado, teor de gordura 3,2% m / v., vendido na cidade de São Paulo. **Boletim da Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 6, n. 1, p. 57-74, 1986.

VIEIRA, M. A. S.; MASSAGUER, P. R. Incidência de *Listeria spp.* em queijos “Minas Frescal” comercializados em Campinas-SP. **Indústria de Laticínios**, São Paulo, ano 4, n. 23, p. 62-65, set./out., 1999.

VIEIRA, M. C. M.; ANDRÉ, M. C. D. P. B.; SERAFINI, A. B.; LIMA, S. V.; SILVA, E. V. Avaliação microbiológica do leite pasteurizado tipo C, comercializado no Estado de Goiás no período de janeiro a junho de 2000. **Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 15, n. 82, p. 72, mar., 2001a.

VIEIRA, M. C. M.; MESQUITA, A. J.; ANDRÉ, M. C. D. P. B.; RABELO, J. A.; LIMA, S. V.; SILVA, E. V. Avaliação da qualidade microbiológica do queijo Minas Frescal produzido no Estado de Goiás. **Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 15, n. 80/81, p. 113, jan./fev., 2001b.

VIEIRA, S. D. A.; NETO, M. J. P. Elaboração de queijos frescais em pequena escala. **Informe Agropecuário**, v. 8, n. 88, p. 28-29, 1982.

VILELA, M. A. P.; REZENDE, P. R.; MEURER, V. M.; ALMEIDA, J. A. Incidência de estafilococos produtores de coagulase em queijo Minas Frescal comercializado na cidade de Juiz de Fora e região. **Revista do Instituto de Laticínios “Cândido Tostes”**, Juiz de Fora, v. 56, n. 321, p. 140-143, jul./ago., 2001.

WALKER, H. W.; AYRES, J. C. Yeasts as spoilage organisms. In: The yeast Technology, **Academic Press**, London, v. 3, p. 464-527, 1970.

WENDPAP, L. L.; ROSA, O. O. Presença de *Staphylococcus aureus* em queijo Minas consumido no município de Cuiabá-MT. **Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 7, n. 27, p. 23-29, ago., 1993.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Listerioses d'origine alimentare. Rapport d'un groupe informel de travail de l'OMS. Organ. Mond. Santé, Geneva, p. 1-19, 1988. WHO/EHE/FOS/88.5.