

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA – UNESP

CÂMPUS DE JABOTICABAL

**QUEIJOS TIPO PARMESÃO RALADOS INDUSTRIALMENTE
E NO ATO DA VENDA, ADQUIRIDOS NO COMÉRCIO
VAREJISTA, COMO FONTES DE AGENTES
DETERIORANTES E PATOGÊNICOS**

Carlos Eduardo Gamero Aguilar

Médico Veterinário

2014

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA – UNESP

CÂMPUS DE JABOTICABAL

**QUEIJOS TIPO PARMESÃO RALADOS INDUSTRIALMENTE
E NO ATO DA VENDA, ADQUIRIDOS NO COMÉRCIO
VAREJISTA, COMO FONTES DE AGENTES
DETERIORANTES E PATOGÊNICOS**

Carlos Eduardo Gamero Aguilar

Orientador: Prof. Dr. Oswaldo Durival Rossi Junior

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp, Câmpus de Jaboticabal, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Medicina Veterinária, Área de Medicina Veterinária Preventiva.

A282q Aguilar, Carlos Eduardo Gamero
Queijos tipo parmesão ralados industrialmente e no ato da venda,
adquiridos no comércio varejista, como fontes de agentes
deteriorantes e patogênicos / Carlos Eduardo Gamero Aguilar. --
Jaboticabal, 2014
iv, 62 p. ; 28 cm

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista,
Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2014
Orientador: Oswaldo Durival Rossi Junior
Banca examinadora: Angela Cleusa de Fatima Banzato de
Carvalho, Hinig Isa Godoy Vicente
Bibliografia

1. Coliformes termotolerantes. 2. Queijo ralado. 3. *Salmonella* spp.
4. *Staphylococcus aureus*. I. Título. II. Jaboticabal-Faculdade de
Ciências Agrárias e Veterinárias.

CDU 619:614.31:637.3

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

Carlos Eduardo Gamero Aguilar – nascido em Ribeirão Preto, São Paulo, em 06 de fevereiro de 1987, é Médico Veterinário, formado em janeiro de 2011, pela Universidade Estadual Paulista – UNESP, Câmpus de Jaboticabal – SP. Foi bolsista do Programa de Educação Tutorial (PET) do curso de Medicina Veterinária da mesma instituição. Desenvolveu iniciação científica no Laboratório de Análise de Alimentos de Origem Animal e Água, da referida Universidade, na área de Microbiologia de Alimentos com bolsa concedida pela Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP). Graduado, trabalhou na Parmalat S/A e na LBR - Lácteos Brasil na área de Qualidade de Leite (Setor Corporativo) e Desenvolvimento de Produtores até agosto de 2012, quando ingressou no Programa de Pós Graduação em Medicina Veterinária Preventiva, da Universidade Estadual Paulista - UNESP, Câmpus de Jaboticabal, sob orientação do Prof. Dr. Oswaldo Durival Rossi Junior.

“A vida é uma peça de teatro que não permite ensaios. Por isso, cante, chore, dance, ria e viva intensamente, antes que a cortina se feche e a peça termine sem aplausos”

Charles Spencer Chaplin

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, Cláudia Helena Gamero Aguilar e Antônio Gomes Aguilar Filho, pelo amor e dedicação na criação dos filhos. Ao meu irmão Fabiano Gamero Aguilar pela amizade e incentivo. A minha eterna companheira Bruna de Oliveira Reis, pelo amor e compreensão.

AGRADECIMENTOS

À Deus por ter me proporcionado o dom da vida para poder enfrentar todas as barreiras que ela nos apresenta.

A Cláudia Helena Gamero Aguilar e Antônio Gomes Aguilar Filho, meus pais, os quais nunca mediram esforços, apesar de todos os percalços, para que seus filhos pudessem encontrar na educação e estudos, um mundo novo. Obrigado pelo amor e ensinamentos fornecidos durante toda a minha vida.

Ao meu irmão Fabiano Gamero Aguilar pelo apoio e incentivo, mesmo que subjetivo, na conclusão de mais uma etapa de meu objetivo profissional.

A Bruna de Oliveira Reis, minha namorada, por ter me mostrado o verdadeiro significado do amor entre um homem e uma mulher, pelo apoio nas horas difíceis nas quais pensava que nada me restava e pela enorme paciência dispensada para o bem estar e felicidade de nosso relacionamento.

Aos meus avós, Maria das Dores Roque Gamero (In Memoriam), Antônio Gomes Aguilar (In Memoriam) e Ida Cassuti Aguilar pelos ensinamentos de vida, bondade e honestidade que me conduzem. Tenho certeza que meus passos muitas vezes são guiados por eles.

Aos meus familiares por fazerem parte do meu dia a dia e o tornarem mais alegre e leve.

Ao professor Dr. Oswaldo Durival Rossi Junior, meu orientador, pela ética e compartilhamento do conhecimento para com seus orientados. Conhecimento esse não somente acadêmico, mas sim pessoal e de vida o qual me ajudou muito em vários momentos pelos quais passei. Obrigado Duri.

Aos professores do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Reprodução Animal por terem despertado minha vocação profissional.

Aos colaboradores da UNESP, em especial a Liliane Biondi Naka (Lila) e ao Waldemar Dibelli Junior (Diba) pelo conhecimento compartilhado por eles para com os alunos.

Aos meus eternos amigos da República Pipino 6 (Daniel, Ricardo e Lucas) e da República Agrotóxico por me ensinarem o verdadeiro significado de amizade e companheirismo.

Aos meus fiéis e sinceros amigos Gabriel Rossi, Ana Carolina Siqueira, Ana Paula Grisólio, Henrique Almeida e em especial a Laryssa Ribeiro pela ajuda nas análises laboratoriais realizadas.

A todos colaboradores das empresas Parmalat e LBR – Lácteos Brasil por me proporcionarem ampliação de meus conhecimentos e de senso crítico.

Aos meus amigos de Ribeirão Preto por compreenderem minha ausência em prol de um objetivo de vida.

SUMÁRIO

Assunto	Página
RESUMO.....	iii
ABSTRACT.....	iv
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	2
3. OBJETIVOS.....	15
3.1 Objetivo Geral.....	15
3.2 Objetivos Específicos.....	15
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	16
4.1 Plano Amostral.....	16
4.1.1 Descrição das Amostras.....	16
4.2 Procedimento Experimental.....	17
4.2.1 Determinação do número mais provável (NMP) de coliformes totais.g ⁻¹	17
4.2.1.1 Teste Presuntivo.....	17
4.2.1.2 Teste Confirmatório.....	17
4.2.2 Determinação do NMP de coliformes termotolerantes e <i>Escherichia coli</i> por grama.....	18
4.2.2.1 Coliformes Termotolerantes.....	18
4.2.2.2 <i>Escherichia coli</i>	18
4.2.3 Contagem padrão de microrganismos heterotróficos aeróbios ou facultativos e mesófilos.....	19
4.2.4 Contagem de <i>Staphylococcus</i> spp., <i>Staphylococcus</i> coagulase positivo e de <i>Staphylococcus aureus</i>	19
4.2.5 Contagem de bolores e leveduras.....	20
4.2.6 Pesquisa de <i>Salmonella</i> spp.....	20
4.2.6.1 Pré-Enriquecimento.....	20
4.2.6.2 Enriquecimento Seletivo.....	21
4.2.6.3 Plaqueamento.....	21
4.2.6.4 Identificação Presuntiva.....	21

4.2.6.5 Sorologia.....	21
4.2.7 Sensibilidade a agentes antimicrobianos.....	22
4.2.7.1 Leitura das placas.....	22
4.3 Análise estatística.....	23
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	24
6. CONCLUSÕES.....	39
7. REFERÊNCIAS.....	40

QUEIJOS TIPO PARMESÃO RALADOS INDUSTRIALMENTE E NO ATO DA VENDA, ADQUIRIDOS NO COMÉRCIO VAREJISTA, COMO FONTES DE AGENTES DETERIORANTES E PATOGÊNICOS

RESUMO - O queijo parmesão ralado, por ser um derivado lácteo, apresenta alto teor de nutrientes e, quando obtido de matérias primas de baixa qualidade e/ou quando houver falhas no processamento, pode apresentar altas populações de microrganismos contaminantes. Com o objetivo de avaliar as condições higiênicas e sanitárias de queijos tipo parmesão ralados vendidos no comércio varejista, foram realizadas análises microbiológicas em 120 amostras, sendo 60 destas de quatro marcas comerciais as quais foram raladas industrialmente e outras 60 de quatro marcas, cujos queijos foram adquiridos pelos comércios varejistas em grandes peças e ralados no ato da venda. As populações de microrganismos heterotróficos mesófilos variaram de $1,2 \times 10^3$ a $1,1 \times 10^7$ UFC.g⁻¹. Todas as amostras analisadas apresentaram *Staphylococcus* spp., com populações que variaram de $1,2 \times 10^3$ a $8,7 \times 10^6$ UFC.g⁻¹, sendo que 60,0% dessas apresentaram *Staphylococcus* coagulase positivo e 52,5 % delas com populações acima do limite estabelecido pela legislação. A presença de *Staphylococcus aureus* e de *Escherichia coli* foi identificada em 57,5 % e 6,6 % das amostras, respectivamente. As populações de bolores e leveduras apresentaram variação de < 10 a $1,8 \times 10^6$ UFC.g⁻¹. *Salmonella* spp não foi isolada no presente trabalho. Houve diferença entre os queijos ralados industrialmente e os queijos ralados nos supermercados, sendo que o primeiro grupo apresentou resultados de qualidade microbiológicas melhores do que o segundo grupo. Assim, medidas visando minimizar as populações de agentes contaminantes e deteriorantes encontradas nos queijos parmesão analisados no presente trabalho devem ser realizadas visto que essas podem representar um perigo a saúde pública.

Palavras-chave: coliformes termotolerantes, queijo ralado, *Salmonella* spp., *Staphylococcus aureus*.

FACTORY AND POINT-OF-SALE GRATED PARMESAN CHEESE ACQUIRED ON RETAIL BUSINESSES AS A SOURCE OF DETERIORATION AND PATHOGENICS AGENTS

SUMMARY - The grated parmesan cheese, being a dairy product, presents high nutrients content and, when obtained from raw material of low quality and/or when there are failures in its processing, may present high populations of contaminants. With the objective to evaluate the hygienic and sanitary conditions of grated parmesan cheese acquired in the retail business, 120 samples were acquired: 60 of these being from four brands which are grated in the factory, and the other 60 samples from another four brands which are acquired by the retailers (supermarkets) in blocks and grated on the moment of sale. The population of heterotrophic mesophiles microorganisms ranged from $1,2 \times 10^3$ to $1,1 \times 10^7$ UFC.g⁻¹. All of the samples analyzed showed *Staphylococcus* spp. All of the samples analyzed showed *Staphylococcus* spp. with population ranging from $1,2 \times 10^3$ to $8,7 \times 10^6$ UFC.g⁻¹, where 60,0 % were classified as positive coagulase *Staphylococcus* and 52,5 % had population above the established limit by legislation. The presence of *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* were identified in 57,5 % e 6,6 % of the samples, respectively. The population of molds and yeasts ranged from <10 to $1,8 \times 10^6$ UFC.g⁻¹. *Salmonella* spp was not isolated in this research. A difference was observed between the parmesan cheese grated in the factory and in the supermarket, where the first group presented better microbiological quality results than the second group. Thus, procedures with the objective minimize the population of deterioration and pathogenics agents found in grated parmesan cheese evaluated in the present study must be realized seeing that contaminated cheese can represent a danger for public health.

Keywords: termotolerant coliforms, *Salmonella* spp., *Staphylococcus aureus*, grated cheese.

1. INTRODUÇÃO

Fonte de nutrientes, os alimentos são indispensáveis à vida humana. Dentre os alimentos de maior importância nutricional, se destacam o leite e seus derivados. Entretanto, da mesma forma que tais alimentos propiciam nutrientes fundamentais aos seres humanos, esses também são meios ideais para a multiplicação de bactérias patogênicas e deteriorantes, que podem ocasionar diversos danos à qualidade do produto e à saúde do consumidor.

Dentre os derivados lácteos mais comuns e consumidos no Brasil, encontra-se o queijo parmesão ralado, o qual apresenta alto teor de nutrientes. O elevado consumo desse no Brasil advém principalmente devido ao custo baixo e facilidade de obtenção. Assim, possui abrangência de consumo em todas as faixas etárias, desde crianças até idosos que por sua vez já possuem um sistema imune fragilizado. O fato de ser um produto processado e oriundo de uma matéria prima extremamente rica em nutrientes, o torna susceptível a contaminações microbiológicas. Os contaminantes mais comuns e que podem representar riscos à saúde de quem os consumir e diminuir a vida de prateleira dos derivados lácteos são os coliformes termotolerantes, *Staphylococcus* coagulase positivos, *Salmonella* spp., bolores e leveduras, dentre outros.

Em vista do grande consumo do queijo tipo parmesão ralado no Brasil e dos possíveis perigos que esse pode ocasionar à saúde do consumidor, caso esteja contaminado por bactérias patogênicas, emerge a preocupação com a qualidade microbiológica desse derivado vendido no varejo em duas apresentações, sendo uma ralada e embalada industrialmente e a outra ralada no ato da venda pelo comércio varejista.

2. REVISÃO DE LITERATURA

Assim como o homem extrai dos alimentos os nutrientes necessários para sobrevivência e manutenção de seu organismo, esses também são meios fundamentais para as demais classes de seres vivos e dentre estas, se encontram microrganismos patogênicos que podem causar agravos à saúde da população que os ingerirem em número suficiente para isso. Tais alimentos desempenham papel importante na qualidade de vida das populações, particularmente no que se refere à disponibilidade, acessibilidade, qualidade sanitária e nutricional, condições fundamentais para a promoção e proteção da saúde como direito básico de todos os cidadãos (SCHREINER; TEIXEIRA, 2001).

Um dos alimentos de maior importância nutricional aos humanos, desde o nascimento até a idade adulta, é o leite. A possibilidade de encontrar em um só produto proteínas de alta qualidade, vitaminas A, D e B12, riboflavina, minerais e oligoelementos (como o fósforo, magnésio, potássio e zinco) aliado à facilidade de obtenção, o torna um dos melhores alimentos consumidos pelo ser humano (GERRIOR; PUTNAM; BENTE, 1998).

Além do leite fluido propriamente dito, os derivados deste possuem relevante importância nutricional principalmente no que tange aos níveis de Cálcio encontrados neles, como nos queijos, tornando-se assim uma das principais fontes de obtenção deste mineral que é essencial a diversos processos fundamentais para o corpo humano, como a formação óssea, regulação do ritmo cardíaco e pressão arterial, coagulação sanguínea e ativação de sistemas enzimáticos (GERRIOR; PUTNAM; BENTE, 1998).

O Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), pela Portaria 146 de 7 de março de 1996 define queijo como sendo “o produto fresco ou maturado que se obtém por separação parcial do soro do leite ou leite reconstituído (integral, parcial ou totalmente desnatado) ou de soros lácteos, coagulados pela ação física do coalho, enzimas específicas de bactérias específicas, de ácidos orgânicos, isolados ou combinados, todos de qualidade apta para uso alimentar, com ou sem agregação de substâncias alimentícias e/ou especiarias e/ou condimentos, aditivos

especificamente indicados, substâncias aromatizantes e matérias corantes.” Ainda, tal legislação complementa a definição, reservando o nome queijo exclusivamente para produtos cuja base láctea não contenha gordura e/ou proteínas de outras origens (BRASIL, 1996).

Estima-se que o consumo de queijo no Brasil para o ano de 2014, assim como a de leite fluído, seja 2 % superior ao de 2013, chegando a três quilogramas por pessoa por ano. Entretanto, apesar do aumento no consumo deste derivado, ainda está abaixo do recomendado pela Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura (FAO) que é de nove quilogramas por ano por pessoa (USDA, 2013b)

De acordo com Bottazzi et al. (1993) e Stadhouders, Hup e Nieuwenhof (1983), a contaminação dos queijos é proveniente principalmente da contaminação inicial do leite. Sendo assim, para um queijo estar apto para o uso alimentar, é necessário que advenha de uma matéria prima de qualidade para que estes sejam seguros e benéficos à saúde dos consumidores. Para isso, no entanto, é necessário que cuidados higiênicos e sanitários sejam devidamente tomados durante toda a cadeia produtiva, desde a obtenção da matéria prima (leite fluído) na fazenda leiteira até a venda do queijo para o consumidor, visando minimizar possíveis contaminações por microrganismos e outras que possam prejudicar a saúde do consumidor.

Além disso, a contaminação do leite pós tratamento térmico, a utilização de fermentos inativos, temperaturas inadequadas e incorretas condições de produção e armazenagem dos queijos, contribuem também de forma efetiva para o comprometimento da qualidade do produto final (PEREIRA et al., 1999).

A manipulação inadequada dos alimentos favorece a contaminação por agentes bacterianos patogênicos que, em grande número, podem ocasionar problemas à saúde de quem os consumir. Sendo assim, a higiene correta dos alimentos é necessária para garantir a segurança e a salubridade dos mesmos em todos os estágios de sua elaboração.

De acordo com Seridan (2009), o queijo é um alimento de importância relevante nos hábitos de consumo dos brasileiros devido a sua rica composição nutricional e participação histórica na cultura nacional.

Diversos são os tipos de queijos produzidos e consumidos no Brasil e dentre esses se destaca o queijo tipo parmesão. Este derivado de origem italiana é um dos queijos mais populares do Brasil. É classificado como um queijo de baixa umidade, semi-gordo, de massa pré-cozida e prensada. Possui consistência dura e textura compacta, granulosa, com crosta firme, lisa e pode ser fabricado com leite pasteurizado e/ou reconstituído padronizado ou leite cru (PERRY, 2004).

No Brasil, o queijo tipo parmesão é vendido mais comumente na forma ralada previamente industrializada. Nesta apresentação, este acaba por ser um alimento bastante consumido pela população brasileira por ser um produto pronto para o consumo e de fácil obtenção, porém, esse pode oferecer riscos à saúde da população visto que, durante sua produção, há várias etapas de processamento até chegar ao produto final (CAMACHO et al, 2004). Assim, obrigatoriamente deverão ser adotadas boas práticas de fabricação para minimizar os riscos de que microrganismos contaminantes estejam presentes e/ou se multipliquem durante a fabricação deste, atingindo populações maiores do que as determinadas pelos padrões legais tolerados no produto final (HOFFMAN et al., 2004), podendo assim ocasionar danos a saúde de quem os consumir.

De acordo com a Portaria nº 357, de 4 de setembro de 1997, do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), entende-se por "queijo ralado ou queijos ralados, segundo corresponda, o produto obtido por esfarelamento ou ralagem da massa de uma ou até quatro variedades de queijos de baixa umidade aptos para o consumo humano" (BRASIL, 1997).

Em virtude de sua composição, com elevado conteúdo de proteínas, lipídios, carboidratos, sais minerais, cálcio, fósforo e vitaminas, é um alimento bastante nutritivo, mas torna-se também, se contaminado, uma fonte potencial para microrganismos deteriorantes e patogênicos que são provenientes da matéria-prima ou podem ser adquiridos no processamento do produto (PERRY, 2004). Ainda, por ter em sua composição nutrientes de alto valor biológico, este se torna susceptível à multiplicação microbiana, sendo, portanto, um veículo frequente de microrganismos patogênicos que podem causar infecções e intoxicações alimentares (MIRANDA, 2008).

Com raras exceções, o leite utilizado na fabricação de queijos frescos tem de ser pasteurizado. Já o leite para a fabricação de queijos maturados, como o parmesão, pode ser cru desde que sejam respeitados os prazos de maturação e adotadas as boas práticas de fabricação, que incluem desde a exigência de só utilizar leite de alta qualidade até rigorosa higiene no local de produção (PERRY, 2004).

Desta forma, a produção de queijos e/ou manutenção destes em condições inadequadas para consumo, possibilitando assim contaminação microbiana, gera perdas para a indústria e pode trazer graves consequências para a população, se tornando assim, um problema de saúde pública pelo fato de ser uma potencial fonte de doenças transmitidas por alimentos (DTAs) (FEITOSA et al., 2003).

Doenças Transmitidas por Alimentos são causadas pela ingestão de alimentos ou bebidas contaminados com patógenos e/ou toxinas por eles produzidas, em quantidades que afetam a saúde do consumidor (BRASIL, 2014). As DTAs são prevalentes no mundo, sendo responsáveis por grande impacto na economia mundial (SILVA; BERGAMINI; OLIVEIRA, 2009).

De acordo com a Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo – SES/SP, entre 1999 e 2008, foram notificados 2.712 surtos de DTAs, com 76.797 casos, no estado, sendo que 51 % dos surtos estavam associados a alimentos manipulados ou preparados (DDTHA, 2009). Em 2012, foram 155 surtos confirmados por critério laboratorial e/ou clínico epidemiológico com 6.191 casos e três óbitos (DDTHA, 2014). Ressalta-se ainda que os números apresentados sejam menores dos que os reais, devido à falta de diagnóstico final confirmatório por parte dos serviços de saúde. Segundo De Buyser (2001), é difícil estimar a proporção de doenças transmitidas por leite e derivados, devido às limitações dos sistemas de vigilância.

Os principais microrganismos envolvidos em contaminações do leite e derivados são as bactérias (MENDES; SILVA; ABRANTES, 2009). Entretanto, bolores e leveduras também apresentam participação, apesar de reduzida, como contaminantes nestes alimentos e igualmente devem ser mensurados. Dessa forma, a avaliação da presença e das populações de alguns microrganismos específicos torna-se fundamental vistos os potenciais perigos que tais podem acarretar à saúde humana quando ingeridos, destacando-se os *Staphylococcus* coagulase positivos,

Salmonella spp., *Listeria monocytogenes*, bolores, leveduras e enterobactérias, onde esta incluído o grupo dos coliformes.

Os coliformes são bactérias Gram-negativas, não esporuladas, que fermentam a lactose, produzem ácido e gás quando incubados a 36°C por 24-48 horas (JAY, 2005; BRASIL, 2003; SILVA; JUNQUEIRA; SILVEIRA, 1997). Dentro do grupo dos coliformes totais, encontra-se um subgrupo denominado coliformes termotolerantes. Bactérias de tal subgrupo são originárias do trato gastrointestinal de humanos e de outros animais, além de representantes não fecais que são destruídos através de tratamentos térmicos, como a pasteurização. Assim, a presença deste grupo em alimentos processados é considerada uma indicação de contaminação pós-sanitização ou pós-processo, evidenciando práticas de higiene e sanitização abaixo dos padrões exigidos para o processamento de alimentos (SILVA, JUNQUEIRA, SILVEIRA, 2001).

Do ponto de vista sanitário, os coliformes termotolerantes apresentam-se como indicadores capazes de evidenciar uma maior probabilidade de que o alimento tenha entrado em contato com material de origem fecal, caracterizados ainda pela sua capacidade de fermentar a lactose com produção de ácido e gás à temperatura de 45°C (JORDANO et al., 1995; BRASIL, 2003). Um dos gêneros mais importantes deste grupo é a *Escherichia*. Tal gênero é composto por seis espécies: *E. adecarboxulata*, *E. fergusonii*, *E. hermannii*, *E. vulneris*, *E. blattae* e *E.coli*, sendo a última a espécie de maior relevância.

E. coli é uma bactéria Gram-negativa, pertencente à família Enterobacteriaceae (BRENER, 1984). Ela faz parte da microbiota entérica de mamíferos e aves e é frequentemente isolada em alimentos, incluindo produtos lácteos (NATARO; KAPER, 1998).

E. coli é um dos principais microrganismos isolados em casos de diarreia em humanos e em diferentes espécies animais (NATARO; KAPER, 1998). Entretanto, a maioria destas cepas são comensais não patogênicas. De acordo com Francis (2002), cepas toxigênicas de *E. coli* causam diarreia aquosa profusa e/ou lesões vasculares sistêmicas devido à liberação de enterotoxinas como as toxinas termoestável (St_a e St_b), termo-lábil (LT) e Shiga toxina (Stx₁ e Stx₂).

Por tais motivos, a *E. coli* é rotineiramente utilizada para evidenciar contaminação de origem fecal e, sendo assim, é desejável a determinação de sua ocorrência em uma população de coliformes (JAY, 2005).

Ainda em relação às DTAs, outro gênero de grande destaque é o *Staphylococcus*, o qual pertence à família Micrococcaceae. São células esféricas com 0,5 a 1,5 μm de diâmetro e se apresentam de forma individual, aos pares ou em agrupamentos. São Gram positivas, imóveis, não esporuladas, aeróbias ou anaeróbias facultativas e possuem metabolismo respiratório ou fermentativo (GOMES, 2013). São subdivididas em 32 espécies e subespécies (DOYLE; BEUCHAT; MONTVILLE, 2007). A capacidade de algumas dessas espécies de produzir a enzima coagulase, as classificam em dois grupos: coagulase positivos e coagulase negativos (GOMES, 2013). Dentre as espécies de *Staphylococcus* coagulase positivos, o *S. aureus* é a mais comumente associada a casos e surtos de intoxicação de origem alimentar, devido à capacidade de muitas de suas cepas produzirem diversos tipos de enterotoxinas (OMOE et al., 2005). Outras espécies coagulase positivos, como *S. intermedius* (BECKER et al., 2001) e *S. hyicus* (ADESIYUN et al., 1984), também produzem enterotoxinas e podem estar relacionadas e responsabilizadas por muitos dos surtos ocorridos. Tais enterotoxinas são formadas durante a multiplicação de bactérias do gênero mencionado (BREWER, 1991).

A intoxicação estafilocócica é a causa mais frequente de surtos de DTAs em diversos países. Surtos e casos de intoxicação alimentar atribuídos ao consumo de produtos lácteos, principalmente derivados como os queijos, têm sido descritos mundialmente (CARMO et al., 2002; INPPAZ/OPS/OMS, 2006). Outra característica importante é a termoestabilidade de suas toxinas, sendo capazes de resistirem a tratamentos térmicos como a pasteurização e a ultrapasteurização (BORGES et al., 2008). Sendo assim, mesmo que os microrganismos sejam destruídos por possíveis tratamentos térmicos utilizados no alimento, suas toxinas formadas previamente permanecerão intactas e com potencial poder de desencadear uma intoxicação de origem alimentar.

Denomina-se gastroenterite estafilocócica a inflamação do trato gastrointestinal ocasionada pela ingestão de enterotoxinas oriundas de bactérias do gênero

Staphylococcus. De acordo com a susceptibilidade do indivíduo e pela quantidade de toxina ingerida pelo mesmo, o período de incubação varia de 30 minutos a 8 horas (CUNHA NETO; SILVA; STAMFORD, 2002; ZOLI, NEGRETE; OLIVEIRA, 2002).

Ainda, salienta-se a importância do *S. aureus* como causador de mastite subclínica em vacas de leite (ZAFALON et al, 2007). Coerentemente, também é o microrganismo mais isolado em leite cru (ZECCONI; HAHN, 2000).

De acordo com Melo (2008) e Santos (2009), o *S. aureus* possui a capacidade de formar biofilmes em equipamentos de ordenha. Zafalon et al. (2008) isolaram *S. aureus* em insufladores. Sendo assim, a presença de *Staphylococcus* nos alimentos é encarada como um indicador de deficiências higiênica e/ou sanitárias no processo de obtenção e manipulação do alimento (BORGES et al, 2008).

Em trabalho realizado com bovinos leiteiros no Estado de Nova Iorque, EUA, 28,6% (75) das cepas de *S. aureus* isoladas do úbere apresentavam capacidade de secretarem uma ou mais toxinas (KENNY et al, 1993). Matsunaga, Kamata, Kikiichi (1993), no entanto, encontraram 34,5% de cepas enterotoxigênicas. Girardini (2013) cita que as infecções intramamárias causadas pelo *S. aureus* possuem papel importante na Saúde Pública, visto que, as toxinas excretadas por estes podem permanecer estáveis nos produtos oferecidos ao consumidor. Sendo assim, a possibilidade da presença de cepas produtoras de enterotoxinas determina um risco potencial à saúde humana, associado ao consumo de leite e dos derivados deste, como os queijos.

Diversos estudos relatam a ocorrência de enterotoxinas estafilocócicas no leite e nos produtos lácteos. Segundo Rosec et al. (1997), ao analisar queijos elaborados com leite cru, foi observada a presença de toxina do tipo C em 73,7% das 61 amostras analisadas, número considerado elevado pelo autor.

S. aureus é, com frequência, também encontrado na pele, boca e fossas nasais dos seres humanos e, sendo assim, pode com facilidade alcançar os alimentos e os contaminar (MURRAY; ROSENTHAL, 2000). Em estudo realizado no município de Ribeirão Preto, SP, foram avaliadas as mãos, boca e fossas nasais de 67 manipuladores de alimentos, sendo que 41,8 % destes eram portadores de *S.*

aureus, uma taxa considerada alta pelos autores (VANZO; AZEVEDO, 2003). Em trabalho semelhante realizado na cidade de Araraquara, SP, 44,1 % dos manipuladores de alimentos submetidos à pesquisa apresentaram relevantes populações de *Staphylococcus aureus* nas mãos ou fossas nasais, o que indica um perigo de contaminação aos alimentos por eles manipulados (RADDI; LEITE; MENDONÇA, 1988).

CUNHA NETO; SILVA; STAMFORD (2002) afirma que a presença deste microrganismo é indicativa de condições não satisfatórias de higiene em decorrência de inadequações, sejam elas na manipulação, limpeza ou sanitização dos equipamentos e utensílios.

Dados da Organização Mundial da Saúde (OMS) colocam os manipuladores como responsáveis diretos ou indiretos por 26% dos surtos de DTAs (FREITAS, 1995).

Outro gênero que merece atenção quando o tópico são DTAs e é de fundamental importância no âmbito da saúde pública é o gênero *Salmonella*. Microrganismos deste gênero pertencem à família Enterobacteriaceae, são Gram-negativos, se apresentam sob a forma de bacilos, não são produtores de esporos, e a maioria possui flagelo peritríquios, o que lhes dá a mobilidade (com exceção à *S. pullorum* e à *S. gallinarum* que não os possuem).

Bioquimicamente, são classificadas sendo oxidase negativas e catalase positivas, como todos os membros da família a qual pertencem. Fermentam glicose e reduzem o nitrato a nitrito. A temperatura ótima para a multiplicação do gênero é de 37°C, entretanto se multiplicam na faixa de 5°C a 45°C (VARNAM; EVANS, 1991).

De acordo com Popoff, Bockemuhl e Gheesling (2004), o gênero *Salmonella* é subdividido em duas espécies: *S. bongori* e *S. enterica*, sendo que a última é subdividida em mais seis subespécies: *S. enterica* subespécie *enterica*, *S. enterica* subespécie *salamae*, *S. enterica* subespécie *arizonae*, *S. enterica* subespécie *diarizonae*, *S. enterica* subespécie *houtenae* e *S. enterica* subespécie *indica*, sendo que o ser humano parece ser susceptível a todas elas.

Dentre as espécies citadas do gênero, são conhecidos ainda mais de 2500 sorotipos de *Salmonella* e estes são agrupados de acordo com antígenos somáticos e flagelares, conforme modelo de Kauffman-White (EKDAHL et al, 2005).

Estudos epidemiológicos realizados em diversos países situam as salmonelas dentre os agentes patogênicos mais frequentemente encontrados em surtos de DTAs, tanto em países desenvolvidos, como em desenvolvimento. Ainda, enfatizam que os produtos lácteos são importantes veículos de transmissão de *Salmonella* spp. (ÁVILA; GALO, 1996).

Estima-se que 1,4 milhões de casos de salmoneloses tenha ocorrido nos Estados Unidos em 2012, sendo que apenas 40.000 foram confirmados por cultura microbiológica e, destes, 400 foram fatais (CDC, 2012).

Nos países em desenvolvimento, as diarreias agudas causadas por água ou alimentos contaminados, constituem a principal síndrome das febres tifóide, paratifóide e das salmoneloses, que são responsáveis por elevadas taxas de mortalidade e morbidade infantil (ÁVILA; GALO, 1996). Normalmente, as Salmonelas são encontradas no trato intestinal de animais domésticos e selvagens, especialmente aves e répteis, e tem como principais veículos de disseminação alimentos e a água (JAY, 1992). Ainda, a contaminação dos alimentos por essas bactérias pode ocorrer devido ao controle inadequado de temperatura, manipulação incorreta ou contaminação cruzada (FORSYTHE, 2002).

Outro fato que pode evidenciar uma possível produção do produto sob condições de higiene não satisfatórias é a presença de bolores e leveduras em níveis não adequados. Além disso, outros fatores contribuem para o aumento de número de microrganismos indesejáveis neste tipo de queijo. Seu processo de maturação é realizado em câmara com temperatura inferior a 18°C por longos períodos de tempo. Com isso, pode ocorrer a multiplicação de contaminantes na superfície do produto, com predomínio de bolores e leveduras (LANITA; SILVA, 2008). Tais microrganismos, quando presentes em queijos, são os principais deteriorantes do produto (FEITOSA et al., 2003), o que ressalta a importância do controle destes.

O crescimento de bolores e leveduras nas superfícies de queijos tipo parmesão não é desejável, ao contrário de outros queijos, como o Camembert e Brie, nos quais algumas espécies de fungos participam do processo de maturação (TANIWAKI; SILVA, 2001). Esses, de forma indesejável, podem causar mudanças drásticas na composição química, estrutura e aparência do produto, o que pode

causar uma rejeição por parte do consumidor, ocasionando perdas financeiras (LANITA; SILVA, 2008).

Acredita-se que tais fungos, em sua maioria, quando encontrados em queijos duros, como o parmesão, não sejam patogênicos, causando apenas alterações químicas e físicas. Entretanto, não se pode descartar o risco a saúde pública caso a multiplicação seja exacerbada. Apesar de incomum, bolores da espécie *Aspergillus flavus*, os quais produzem a aflatoxina B1, já foram isolados em queijos (FURTADO, 2005).

Outro gênero de suma importância em leite e derivados é a *Listeria*. Tal gênero é composto pelas espécies *L. monocytogenes*, *L. ivanovii*, *L. seeligeri*, *L. innocua*, *L. welshimeri* e *L. grayi* (ROCOURT; BUCHRIESER, 2007), sendo a *Listeria monocytogenes* a espécie de maior relevância devido à patogenicidade ao ser humano, a qual é causadora da enfermidade denominada listeriose. De acordo com Bemrah et al (1999), esta é um dos mais comuns contaminantes em leite e derivados.

Os queijos são os derivados lácteos mais comumente contaminados por *L. monocytogenes*, principalmente os de alta e média umidade. A presença dessa bactéria nesses tipos de queijos é preocupante e torna-se um perigo a saúde pública, devido ao armazenamento por longos períodos sob refrigeração, o que permite sua multiplicação e conseqüente exacerbação do número de microrganismos. Queijos macios maturados por fungos parecem oferecer boas condições para o desenvolvimento da bactéria, possivelmente em função do aumento do pH durante a maturação. Já queijos duros, como o parmesão, apresentam pH ácido e baixa atividade de água e não permitem a multiplicação de *L. monocytogenes* (RYSER; MARTH, 1991). Numa avaliação de risco de transmissão de *L. monocytogenes*, os queijos duros foram classificados como os de menor risco (UNITED STATES, 2003).

Além da contaminação dos alimentos pelos microrganismos mencionados devido à falta de higiene dos profissionais responsáveis pela obtenção e manuseio do produto, outro aspecto de relevância é a contaminação dos alimentos por utensílios e equipamentos mal higienizados, que em contato com os mesmos, acabam por carrear grandes populações de microrganismos, tornando-os, muitas

vezes, inadequados para o consumo. De acordo com Abreu et al. (2010a), equipamentos e utensílios com falhas na higienização podem corresponder por até 16% dos surtos por DTAs, visto ainda que, muitas vezes, indústrias e estabelecimentos varejistas de alimentos possuem, muitas vezes, deficiência na temática de higienização (SILVA, 2006).

De acordo com Silva Junior et al (2001), a higienização pode ser definida como o processo de remoção de sujidades, em um determinado período de tempo, mediante a utilização de produtos químicos, ações mecânicas ou térmicas que possam auxiliar na remoção de componentes do produto que estavam em contato com o equipamento, evitando que possíveis contaminantes se multipliquem no mesmo.

Diversos autores (ANDRADE; SILVA; BRABES, 2003; MONTEIRO; BRUNA, 2004) afirmam que equipamentos que têm contato direto com os alimentos, devem passar constantemente por avaliações microbiológicas para controle da eficácia do procedimento de sanitização, evitando-se a contaminação dos alimentos produzidos.

Diante de tal importância, principalmente dos microrganismos citados e visando obter uma higienização adequada, criaram-se padrões de avaliação do produto quanto a tais possíveis contaminantes.

Parâmetros microbiológicos foram definidos pelo MAPA através da Portaria nº 357, de 4 de setembro de 1997, que aprovou o Regulamento Técnico para Fixação de Identidade e Qualidade de Queijo Ralado (BRASIL, 1997). Tal legislação define valor máximo de 10^3 UFC.g⁻¹ para *Staphylococcus* coagulase positivo, de 10^3 UFC.g⁻¹ para coliformes a 30°C, de 5×10^2 NMP.g⁻¹ para coliformes a 45°C, ausência de *Salmonella* spp. em 25 gramas de amostra e para bolores e leveduras níveis máximos de 5×10^3 UFC.g⁻¹. Entretanto, salienta-se que tal legislação refere-se aos limites de populações a nível industrial, visto que no comércio esses limites são regulamentados pela RDC n.º12. (BRASIL, 2001) que delimita, para queijos ralados de baixa umidade, um limite máximo para coliformes a 45°C de 10^3 NMP.g⁻¹, *Staphylococcus* coagulase positivo de 10^3 UFC.g⁻¹ e ausência de *Salmonella* spp. em 25g do produto.

De acordo com Mattar et al (2011), em pesquisa realizada com queijos ralados industrialmente tipo parmesão adquiridos no Estado de Minas Gerais, foram

encontradas amostras contaminadas por *Staphylococcus* spp. (32,0 %), por enterobactérias (36,0 %) e por fungos filamentosos (77,0 %). O alto nível de contaminação encontrado pelos autores citados indica que o queijo ralado comercializado no Estado de Minas Gerais pode representar risco à saúde de quem os consumir. Resultados semelhantes foram obtidos por Abreu et al. (2010b) em estudo realizado também no Estado de Minas Gerais, em que 18% das amostras analisadas apresentaram populações além da permitida pela legislação para *Staphylococcus* coagulase positivos (10^3 UFC.g⁻¹). 32,0 % com populações acima de 10^3 UFC.g⁻¹ para enterobactérias e 41 % com níveis considerados elevados para bolores e leveduras (10^3 UFC.g⁻¹).

Oliveira et al. (2012), analisando amostras de queijo ralado adquiridas no município de Juiz de Fora, MG, encontraram populações acima do permitido pela legislação vigente para bolores e leveduras em 40,0 % das amostras e 15,0 % com populações próximas aos limites estabelecidos demonstrando assim, possivelmente, falta de higiene durante o processamento ou a utilização de matérias primas contaminadas. Nogueira, Mariotti e Bueno (2013), em estudo realizado no município de São José do Rio Preto, SP, constataram populações fora dos padrões para *Staphylococcus* coagulase positivos e *Salmonella* spp. em, respectivamente, 13,3 % e 6,6 % das amostras de queijo parmesão ralados analisadas e 13,3 % com populações de bolores e leveduras consideradas elevadas pelo autor. Em pesquisa semelhante ocorrida na cidade de Caxias do Sul, RS, Salvador et al (2001) encontram 40,0 % das amostras com populações de *Staphylococcus aureus* superiores a $1,0 \times 10^3$ UFC.g⁻¹ e 30,0 % com populações de bolores e leveduras superiores a $5,0 \times 10^3$ UFC.g⁻¹.

Entretanto, os autores Trombete, Fraga e Saldanha (2012), em pesquisa executada no município do Rio de Janeiro, RJ, não encontraram *Staphylococcus* coagulase positivos e *Salmonella* spp. nas amostras analisadas. Apenas uma delas apresentou resultado microbiológico insatisfatório para bolores e leveduras, com população de $3,0 \times 10^5$ UFC.g⁻¹. Os resultados encontrados pelos autores citados condizem com o encontrado por Pimentel et al (2002), onde os mesmos não constataram populações de *Staphylococcus* coagulase positivos e *Salmonella* spp. em queijos parmesão ralados adquiridos no município de Belo Horizonte, MG.

Diante das informações acima citadas, da pouca pesquisa relacionada às características microbiológicas do queijo tipo parmesão ralado e da importância que este possui na alimentação do brasileiro, por ser um produto de fácil obtenção e custo relativamente baixo, objetivou-se a realização deste estudo.

3. OBJETIVOS

3.1. OBJETIVO GERAL

- Avaliação das características higiênicas e sanitárias de queijos tipo parmesão ralados de oito diferentes marcas comerciais, sendo quatro raladas industrialmente e quatro raladas no ato ou momentos antes da venda, adquiridas no comércio varejista de Ribeirão Preto, SP, tendo como parâmetro a RDC n.º12 de 2 de janeiro de 2001 (ANVISA) e a Portaria n.º 357, de 4 de setembro de 1997 (MAPA).

3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Enumerar microrganismos heterotróficos aeróbios ou facultativos e mesófilos.
- Quantificar *Staphylococcus* spp., *Staphylococcus* coagulase positivos e *Staphylococcus aureus*.
- Determinar o número mais provável de coliformes totais, coliformes termotolerantes e *Escherichia coli*.
- Quantificar bolores e leveduras
- Pesquisar, Isolar e tipificar *Salmonella* spp.
- Identificar, in vitro, os antimicrobianos mais eficazes contra as cepas de *Salmonella* isoladas e tipificadas.
- Comparar os métodos de ralagem (industrial e no ato da venda) quanto às populações de microrganismos contaminantes.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 PLANO AMOSTRAL

Foram adquiridas no comércio varejista de Ribeirão Preto/SP, entre junho de 2013 e janeiro de 2014, 120 amostras de queijo ralado tipo parmesão, sendo que 60 unidades oriundas de quatro marcas diferentes (marcas A, B, C e D), 15 amostras de cada marca e de mesmo lote, todas elas raladas industrialmente. Outras 60 unidades, 15 de cada marca (denominados E, F, G e H) e raladas no momento da venda, foram adquiridas em quatro estabelecimentos varejistas. Tais estabelecimentos adquirem o queijo parmesão em grandes peças e estas são raladas às vistas do consumidor ou momentos antes. Salienta-se que todas as amostras possuíam selos de inspeção estadual ou federal. As amostras foram colhidas em sua embalagem original, quando raladas industrialmente, ou na embalagem do supermercado quando raladas no momento da venda e levadas ao Laboratório de Análise de Alimentos de Origem Animal e Água, do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Reprodução Animal da Universidade Estadual Paulista – Campus de Jaboticabal SP, onde foram realizadas as análises microbiológicas.

4.1.1 DESCRIÇÃO DAS AMOSTRAS

As amostras raladas industrialmente são comercializadas em embalagens plásticas contendo 50 gramas do queijo e não necessitam de refrigeração no ponto de venda devido ao queijo ser constituído por massa seca e curada, o que dispensa a conservação pelo frio. Já os queijos parmesão que foram ralados nos comércios varejistas, foram armazenados em sacos plásticos que os próprios estabelecimentos forneceram, refrigerados e retirados da embalagem somente para análise.

4.2. PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

Uma vez no laboratório as embalagens foram descontaminadas com etanol a 70% e abertas nas proximidades da chama do bico de Bunsen com o auxílio de instrumental esterilizado. Após a abertura das mesmas, o conteúdo foi revolvido com uma espátula esterilizada para uma completa mistura e homogeneização.

Foram retirados 25g de queijo ralado de sua embalagem original e colocados em frascos esterilizados, acrescidos de 225mL de água peptonada tamponada a 0,1%. Foram homogeneizadas e posteriormente preparadas diluições até 10^{-4} para a realização das análises.

Para a determinação do número mais provável (NMP) de coliformes totais.g⁻¹; NMP de coliformes termotolerantes e de *Escherichia coli* por grama; contagem padrão de microrganismos heterotróficos aeróbios ou facultativos, mesófilos; pesquisa de *Salmonella* spp., e ainda, contagem de *Staphylococcus* spp., *Staphylococcus* coagulase positivo e de *Staphylococcus aureus* a metodologia foi baseada nas técnicas descritas em American Public Health Association (APHA, 2001).

4.2.1 DETERMINAÇÃO DO NÚMERO MAIS PROVÁVEL (NMP) DE COLIFORMES TOTAIS POR GRAMA

4.2.1.1 TESTE PRESUNTIVO

A partir das diluições, foram inoculadas 1 mL, respectivamente, em três tubos de caldo lauril sulfato triptose com tubo de Durham invertido. Depois permaneceram incubados a 35°C por 24 a 48 horas e foram considerados positivos apenas aqueles que revelaram multiplicação bacteriana e produção de gás.

4.2.1.2 TESTE CONFIRMATÓRIO

Dos tubos considerados positivos, no teste presuntivo, foram transferidos com auxílio de uma alça de níquel-cromo, uma alçada da cultura para tubos correspondentes contendo caldo lactose – verde brilhante – bile a 2% e tubo de Durham invertido. A incubação se deu em temperatura de 35°C por 24 a 48 horas. Foram considerados positivos os tubos que revelaram a presença de desenvolvimento bacteriano e produção de gás. O resultado final foi obtido ao se comparar os números de tubos positivos com os dados da tabela de Hoskins, considerando sempre três diluições consecutivas a partir da maior diluição com três tubos positivos.

4.2.2 DETERMINAÇÃO DO NMP DE COLIFORMES TERMOTOLERANTES E *Escherichia coli* POR GRAMA

4.2.2.1 COLIFORMES TERMOTOLERANTES

Os tubos de caldo lauril sulfato triptose que foram considerados positivos no teste presuntivo para coliformes totais, foram inoculados em tubos correspondentes contendo caldo *Escherichia coli* (Caldo EC) e tubo de Durham invertido. A incubação foi realizada em banho-maria a 45,5±0,2°C por 24±2 horas e os tubos que apresentaram multiplicação bacteriana e produção de gás, foram considerados positivos. O resultado final foi obtido ao se comparar os números de tubos positivos com os dados da tabela de Hoskins, considerando sempre três diluições consecutivas a partir da maior diluição com três tubos positivos.

4.2.2.2 *Escherichia coli*

A partir dos tubos contendo caldo EC que apresentaram resultados positivos para coliformes termotolerantes, foram semeadas placas de ágar eosina-azul de metileno (EMB) que permaneceram incubadas a 35°C por 24 horas. Após a incubação, três a cinco colônias características (de cor negra, chata, seca e com brilho metálico) foram isoladas de cada placa e inoculadas em ágar nutriente inclinado.

Após incubação a 35°C por 24 horas, foram preparados esfregaços corados pelo método de Gram, para verificar a morfologia bacteriana. Uma vez constatada a presença de bacilos Gram-negativo, em cultura pura, estes foram semeados em meios para a identificação bioquímica através das provas do IMViC: produção de indol (I), de Vermelho de Metila (VM), de Voges-Proskauer (VP) e de aproveitamento de citrato (C)). Na realização destas provas foi adotada a metodologia descrita por Macfaddin (1976).

4.2.3 CONTAGEM PADRÃO DE MICRORGANISMOS HETEROTRÓFICOS AERÓBIOS OU FACULTATIVOS E MESÓFILOS

Nestas determinações, foi depositado 1 mL de cada diluição no fundo de placas de Petri esterilizadas. Em seguida, foram adicionados cerca de 15mL de ágar padrão para contagem fundido e resfriado a temperatura em torno de 45°C. Após homogeneização e solidificação do ágar em temperatura ambiente, as placas foram incubadas a 37°C por 48 horas.

As contagens foram realizadas em contador de colônias, segundo a técnica padrão, preferencialmente em placas com 25 a 250 colônias. O número de colônias contadas na placa, multiplicado pelo fator de diluição correspondente, forneceu o número de microrganismos mesófilos por grama da amostra analisada.

4.2.4 CONTAGEM DE *Staphylococcus* spp., *Staphylococcus* COAGULASE POSITIVOS E DE *Staphylococcus aureus*

Foram retirados 0,1 mL das diluições e depositados em placas contendo ágar Baird-Parker. Após, o inóculo foi distribuído por toda a superfície do meio, utilizando um bastão de vidro em forma de “L” esterilizado. Em seguida, as placas foram incubadas a 35°C por 24 a 48 horas. Após a incubação foram contadas, nas placas contendo entre 20 a 200 colônias, aquelas que por ventura se apresentavam negras, brilhantes, com zona de precipitação ao redor e circundadas ou não por halo claro.

Na ocorrência de colônias com estas características, cinco de cada amostra foram semeadas em tubos contendo ágar nutriente inclinado e incubadas a 35°C por

24 horas. Foram preparados esfregaços corados pelo método de Gram e as culturas que se apresentavam em forma de cocos Gram-positivos e que se encontravam agrupadas em forma de cachos de uva, foram submetidas à prova de catalase para confirmar o gênero.

Em caso de confirmação do gênero, foi realizada a prova de coagulase livre com plasma de coelho citratado. O resultado final da contagem de *Staphylococcus* coagulase positivo foi obtido com base no resultado da prova de coagulase livre proporcionalmente à população de *Staphylococcus*. Dentre as cepas coagulase positivos foi confirmada a presença de *Staphylococcus aureus*, por meio das provas de fermentação do manitol em anaerobiose, e produção de acetoina (VP), de acordo com metodologia descrita por MacFaddin (1976).

4.2.5 CONTAGEM DE BOLORES E LEVEDURAS

Para determinação da população de bolores e leveduras, 0,1 mL das diluições 10^{-1} e 10^{-3} foram inoculados em superfície de placas contendo ágar extrato malte, suplementado com ácido láctico a 10%, até pH de 3,5. As placas permaneceram incubadas por cinco dias a temperatura entre 22 e 25°C. Após o período de incubação foram contadas, preferencialmente, as placas contendo entre 10 e 150 colônias. Obteve-se a população de bolores e leveduras multiplicando-se o número de colônias pelo fator de diluição, o resultado foi multiplicado por dez para considerar o volume de 0,1 mL inoculado.

4.2.6 PESQUISA DE *Salmonella* spp.

4.2.6.1 PRÉ-ENRIQUECIMENTO

Após o procedimento experimental citado no item 4.2, a mistura queijo diluente restante deste foi transferida para um frasco de vidro esterilizado e mantida por 24 horas a 37°C.

4.2.6.2 ENRIQUECIMENTO SELETIVO

Após a incubação, alíquotas de 2 mL da cultura pré-enriquecida foram repassadas para tubos contendo 20 mL de caldo Selenito, acrescidos de solução de novobiocina (0,004%) e 0,2 mL para tubos contendo 20 mL de caldo Rappaport-Vassiliads também acrescido de solução de novobiocina (0,004%), nos quais foram incubados a 37°C por mais 24 horas.

4.2.6.3 PLAQUEAMENTO

Fazendo uso de alça de níquel-cromo, as culturas em enriquecimento seletivo foram semeadas em placas contendo ágar verde brilhante e ágar de Mac Conkey, as quais foram incubadas a 37°C por 24 horas.

4.2.6.4 IDENTIFICAÇÃO PRESUNTIVA

Após 24 horas incubadas, as placas contendo ágar verde brilhante e ágar Mac Conkey foram verificadas quanto à presença de colônias sugestivas do gênero *Salmonella*. As colônias bacterianas que exibissem crescimentos compatíveis com o gênero *Salmonella*, seriam transferidas para o agar tríplice açúcar Ferro (TSI) inclinado e agar lisina ferro (LIA) inclinado, e incubadas a 37°C por 24 horas. Após o período, as colônias que apresentassem características sugestivas do gênero seriam semeadas em Agar Lúria Bertani (LB) e posteriormente incubadas a 37°C por 24 horas.

4.2.6.5 SOROLOGIA

Caso as colônias bacterianas apresentassem crescimentos compatíveis com o gênero *Salmonella*, estas seriam submetidas ao teste de aglutinação em lâmina, com a adição de soros anti-antígenos somáticos “O” e anti-antígenos flagelares “H” de *Salmonella* spp. As colônias que reagissem positivamente seriam transferidas

para tubos contendo agar nutriente e posteriormente enviadas ao setor de bacteriologia do Instituto Adolfo Lutz de São Paulo/SP para tipagem.

4.2.7 SENSIBILIDADE A AGENTES ANTIMICROBIANOS

Os testes de sensibilidades aos antimicrobianos seriam realizados de acordo com a técnica descrita por Kirby-Bauer (Bauer et al. 1966). As colônias bacterianas seriam transferidas para 10 mL de caldo infusão cérebro-coração (BHI) e incubadas sob agitação a 37°C overnight. Após a incubação, as culturas seriam centrifugadas sob refrigeração e a turbidez do precipitado ajustada a 0,5 da escala de McFarland (preparada pela adição de 0,5 ml de uma solução 0,048 M de cloreto de bário a 99,5 ml de ácido sulfúrico a 1% (v/v)) em solução salina 0,85%.

A suspensão bacteriana seria difundida na superfície de Agar Mueller-Hilton (MH), com o auxílio de swab estéril, onde permaneceria em temperatura ambiente por cerca de 15 minutos. Posteriormente seriam inseridos discos impregnados com os seguintes antimicrobianos: gentamicina (10mcg), netilmicina (30mcg), carbenicilina (100mcg), cloranfenicol (30mcg), tetraciclina (30mcg), amicacina (30mcg), cefalotina (30mcg), ampicilina (10mcg), tobramicina (10mcg), polimixina B (300mcg), sulfazotrim (25mcg) e cefoxitina (30mcg), resguardando espaço de 2cm do disco para a borda da placa e de 3cm entre os discos. As placas seriam incubadas a 37°C por 24 horas.

4.2.7.1 LEITURA DAS PLACAS

A leitura e interpretação dos resultados seria realizada pela mensuração do halo de inibição formado, utilizando régua milimetrada e seguindo critérios específicos instituídos para cada agente antimicrobiano, estabelecido pelo National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS) (CLSI M100-S21, 2011), classificando as estirpes em sensíveis, intermediárias ou resistentes.

4.3 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para a análise estatística das populações de Mesófilos, *Staphylococcus* spp., *Staphylococcus* coagulase positivos, *Staphylococcus aureus* e bolores e leveduras, foi aplicado o teste de Kruskal-Wallis ($p < 0,05$) afim de comparar os grupos (THEODORSSON-NORHEIM, 1986). Quando da ocorrência de diferenças significativas, procedeu-se ao Teste *post hoc* de Comparações Múltiplas de Dunn a fim de se verificar a direção das diferenças.

Quanto às análises de coliformes totais, coliforme termotolerantes e *Escherichia coli*, os resultados (presença ou ausência) foram analisados através da aplicação do teste de Qui-quadrado ao nível de 1 % de significância (CDC, 2014).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados apresentados na Tabela 1 referem-se às contagens padrão em placas de microrganismos heterotróficos mesófilos em queijos tipo parmesão ralados industrialmente (marcas A, B, C e D) e ralados no ato da venda (marcas E, F, G, e H).

Observa-se que as populações do grupo ralado industrialmente variaram de $1,2 \times 10^3$ a $1,7 \times 10^5$ UFC.g⁻¹ e as do grupo ralado no ato da venda de $1,2 \times 10^5$ a $1,2 \times 10^7$ UFC.g⁻¹. Quando comparados estatisticamente, os dois grupos diferiram entre si (teste de Dunn, $p < 0,05$).

Ressalta-se que a contagem de microrganismos heterotróficos mesófilos em alimentos fornece informações sobre as características higiênicas e sanitárias no processamento e armazenamento do produto (VIDAL-MARTINS; ROSSI JUNIOR; REZENDE-LAGO, 2005) além de que altos níveis deste grupo podem sugerir uma maior possibilidade de albergar microrganismos patogênicos já que a maioria destes pertence ao grupo de bactérias mesofílicas (CARVALHO, 1999).

Em trabalho realizado por Salvador et al (2001) na cidade de Caxias do Sul, RS, foram avaliadas 10 amostras de queijo parmesão ralado industrialmente, supervisionadas pelo SIF. Os autores relataram variação de populações de $2,6 \times 10^2$ a $8,6 \times 10^5$ UFC.g⁻¹. Portanto, o resultado obtido pelos autores reforça os mencionados no presente estudo onde foram encontradas variações, para o grupo ralado industrialmente, de $1,2 \times 10^3$ a $1,7 \times 10^5$ UFC.g⁻¹.

Apesar de não haver na legislação brasileira um limite estabelecido para microrganismos heterotróficos mesófilos em queijos parmesão ralados, alguns autores relatam que alimentos com populações acima de 10^6 UFC.g⁻¹ não devem ser consumidos (ICMSF, 1981), pois podem ser responsáveis por desencadear doenças de origem alimentar (JAY, 2005). Sendo assim, no grupo dos queijos ralados industrialmente, 100,0 % das amostras estavam dentro da faixa aceitável. Entretanto, o grupo dos queijos ralados no ato da venda, observaram-se populações superiores a 10^6 UFC.g⁻¹ em 88,3 % das amostras analisadas.

Tabela 1. População de microrganismos heterotróficos mesófilos, médias aritméticas e desvio padrões em cada uma das amostras de queijos ralados tipo parmesão coletadas em estabelecimentos comerciais varejistas no município de Ribeirão Preto, SP, no ano de 2013.

Número da amostra	Ralados Industrialmente						Ralados no Ato da Venda									
	Marca A (UFC.g ⁻¹)	Marca B (UFC.g ⁻¹)	Marca C (UFC.g ⁻¹)	Marca D (UFC.g ⁻¹)	Marca E (UFC.g ⁻¹)	Marca F (UFC.g ⁻¹)	Marca G (UFC.g ⁻¹)	Marca H (UFC.g ⁻¹)	Marca A (UFC.g ⁻¹)	Marca B (UFC.g ⁻¹)	Marca C (UFC.g ⁻¹)	Marca D (UFC.g ⁻¹)	Marca E (UFC.g ⁻¹)	Marca F (UFC.g ⁻¹)	Marca G (UFC.g ⁻¹)	Marca H (UFC.g ⁻¹)
1	8,3 x 10 ⁴	2,1 x 10 ⁴	9,1 x 10 ³	5,5 x 10 ³	3,4 x 10 ⁶	6,4 x 10 ⁶	1,2 x 10 ⁶	5,9 x 10 ⁶	8,3 x 10 ⁴	2,1 x 10 ⁴	9,1 x 10 ³	5,5 x 10 ³	3,4 x 10 ⁶	6,4 x 10 ⁶	1,2 x 10 ⁶	5,9 x 10 ⁶
2	1,7 x 10 ⁵	1,7 x 10 ⁴	1,0 x 10 ⁴	1,2 x 10 ³	1,8 x 10 ⁶	2,4 x 10 ⁶	8,5 x 10 ⁵	1,2 x 10 ⁵	1,7 x 10 ⁵	1,7 x 10 ⁴	1,0 x 10 ⁴	1,2 x 10 ³	1,8 x 10 ⁶	2,4 x 10 ⁶	8,5 x 10 ⁵	1,2 x 10 ⁵
3	7,8 x 10 ⁴	2,0 x 10 ⁴	1,2 x 10 ⁴	2,5 x 10 ³	3,7 x 10 ⁶	2,4 x 10 ⁶	4,4 x 10 ⁵	1,9 x 10 ⁶	7,8 x 10 ⁴	2,0 x 10 ⁴	1,2 x 10 ⁴	2,5 x 10 ³	3,7 x 10 ⁶	2,4 x 10 ⁶	4,4 x 10 ⁵	1,9 x 10 ⁶
4	1,0 x 10 ⁵	1,5 x 10 ⁴	1,4 x 10 ⁴	8,3 x 10 ³	1,1 x 10 ⁷	4,2 x 10 ⁶	7,9 x 10 ⁵	2,2 x 10 ⁶	1,0 x 10 ⁵	1,5 x 10 ⁴	1,4 x 10 ⁴	8,3 x 10 ³	1,1 x 10 ⁷	4,2 x 10 ⁶	7,9 x 10 ⁵	2,2 x 10 ⁶
5	1,2 x 10 ⁵	1,7 x 10 ⁴	1,0 x 10 ⁴	3,4 x 10 ³	3,9 x 10 ⁶	1,3 x 10 ⁶	4,8 x 10 ⁶	2,9 x 10 ⁶	1,2 x 10 ⁵	1,7 x 10 ⁴	1,0 x 10 ⁴	3,4 x 10 ³	3,9 x 10 ⁶	1,3 x 10 ⁶	4,8 x 10 ⁶	2,9 x 10 ⁶
6	1,0 x 10 ⁵	1,7 x 10 ⁴	3,6 x 10 ⁴	3,6 x 10 ³	3,6 x 10 ⁶	1,5 x 10 ⁶	2,3 x 10 ⁶	2,8 x 10 ⁶	1,0 x 10 ⁵	1,7 x 10 ⁴	3,6 x 10 ⁴	3,6 x 10 ³	3,6 x 10 ⁶	1,5 x 10 ⁶	2,3 x 10 ⁶	2,8 x 10 ⁶
7	1,1 x 10 ⁵	2,6 x 10 ⁴	7,9 x 10 ³	8,9 x 10 ³	2,2 x 10 ⁶	4,9 x 10 ⁶	1,8 x 10 ⁶	4,3 x 10 ⁶	1,1 x 10 ⁵	2,6 x 10 ⁴	7,9 x 10 ³	8,9 x 10 ³	2,2 x 10 ⁶	4,9 x 10 ⁶	1,8 x 10 ⁶	4,3 x 10 ⁶
8	8,5 x 10 ⁴	1,3 x 10 ⁴	1,8 x 10 ⁴	1,4 x 10 ⁴	5,5 x 10 ⁶	3,6 x 10 ⁶	5,6 x 10 ⁶	8,9 x 10 ⁵	8,5 x 10 ⁴	1,3 x 10 ⁴	1,8 x 10 ⁴	1,4 x 10 ⁴	5,5 x 10 ⁶	3,6 x 10 ⁶	5,6 x 10 ⁶	8,9 x 10 ⁵
9	9,8 x 10 ⁴	2,5 x 10 ⁴	1,9 x 10 ⁴	8,9 x 10 ³	3,9 x 10 ⁶	6,7 x 10 ⁶	2,8 x 10 ⁶	1,2 x 10 ⁶	9,8 x 10 ⁴	2,5 x 10 ⁴	1,9 x 10 ⁴	8,9 x 10 ³	3,9 x 10 ⁶	6,7 x 10 ⁶	2,8 x 10 ⁶	1,2 x 10 ⁶
10	1,0 x 10 ⁵	2,0 x 10 ⁴	1,3 x 10 ⁴	9,4 x 10 ³	2,8 x 10 ⁶	6,9 x 10 ⁶	4,5 x 10 ⁶	4,1 x 10 ⁶	1,0 x 10 ⁵	2,0 x 10 ⁴	1,3 x 10 ⁴	9,4 x 10 ³	2,8 x 10 ⁶	6,9 x 10 ⁶	4,5 x 10 ⁶	4,1 x 10 ⁶
11	9,4 x 10 ⁴	1,6 x 10 ⁴	1,5 x 10 ⁴	1,9 x 10 ³	9,7 x 10 ⁶	3,9 x 10 ⁶	9,2 x 10 ⁵	5,8 x 10 ⁶	9,4 x 10 ⁴	1,6 x 10 ⁴	1,5 x 10 ⁴	1,9 x 10 ³	9,7 x 10 ⁶	3,9 x 10 ⁶	9,2 x 10 ⁵	5,8 x 10 ⁶
12	7,9 x 10 ⁴	1,8 x 10 ⁴	1,2 x 10 ⁴	2,4 x 10 ³	1,9 x 10 ⁶	1,3 x 10 ⁶	4,6 x 10 ⁶	9,0 x 10 ⁵	7,9 x 10 ⁴	1,8 x 10 ⁴	1,2 x 10 ⁴	2,4 x 10 ³	1,9 x 10 ⁶	1,3 x 10 ⁶	4,6 x 10 ⁶	9,0 x 10 ⁵
13	1,0 x 10 ⁵	1,5 x 10 ⁴	8,6 x 10 ³	1,2 x 10 ³	1,2 x 10 ⁷	2,4 x 10 ⁶	8,2 x 10 ⁶	1,9 x 10 ⁶	1,0 x 10 ⁵	1,5 x 10 ⁴	8,6 x 10 ³	1,2 x 10 ³	1,2 x 10 ⁷	2,4 x 10 ⁶	8,2 x 10 ⁶	1,9 x 10 ⁶
14	1,1 x 10 ⁵	1,9 x 10 ⁴	1,5 x 10 ⁴	3,6 x 10 ³	2,5 x 10 ⁶	3,2 x 10 ⁶	4,3 x 10 ⁶	8,7 x 10 ⁶	1,1 x 10 ⁵	1,9 x 10 ⁴	1,5 x 10 ⁴	3,6 x 10 ³	2,5 x 10 ⁶	3,2 x 10 ⁶	4,3 x 10 ⁶	8,7 x 10 ⁶
15	8,8 x 10 ⁴	2,0 x 10 ⁴	1,9 x 10 ⁴	4,1 x 10 ³	1,0 x 10 ⁷	5,1 x 10 ⁶	1,4 x 10 ⁶	1,9 x 10 ⁶	8,8 x 10 ⁴	2,0 x 10 ⁴	1,9 x 10 ⁴	4,1 x 10 ³	1,0 x 10 ⁷	5,1 x 10 ⁶	1,4 x 10 ⁶	1,9 x 10 ⁶
Médias aritméticas e desvio padrão	9,8 x 10 ^{4bc} ± 1,3 x 10 ⁴	1,8 x 10 ^{4cd} ± 3,5 x 10 ³	1,4 x 10 ^{4d} ± 6,9 x 10 ³	3,6 x 10 ^{4d} ± 1,7 x 10 ⁴	5,3 x 10 ^{6ab} ± 3,7 x 10 ⁶	6,8 x 10 ^{6a} ± 3,9 x 10 ⁶	5,1 x 10 ^{6ab} ± 3,5 x 10 ⁶	5,0 x 10 ^{6ab} ± 3,1 x 10 ⁶								

Médias seguidas de letras iguais não diferem do ponto de vista estatístico ao nível de 5% de significância (teste de Dunn)

Altas populações de bactérias mesofílicas podem sugerir contaminação da matéria-prima e/ou condições de processamento inadequadas, aumentando a possibilidade de contaminação por microrganismos patogênicos, que podem ocasionar danos à saúde do consumidor, além favorecer a deterioração do produto (FRANCO; ALMEIDA, 1992).

O queijo parmesão ralado, quando produzido de forma que atenda aos critérios higiênicos e sanitários, possui algumas características que podem ajudar a minimizar possíveis multiplicações de bactérias mesofílicas. De acordo com Salvador et al (2001) o fato deste produto conter uma maior quantidade de NaCl e menor atividade de água, ocasiona um efeito inibitório quanto a multiplicação de microrganismos deste grupo.

Sendo assim, considerando que durante o processo fabril tenha sido utilizado os mesmos rigores higiênicos e sanitários, tanto na produção do queijo parmesão de forma ralada quanto na produção do queijo parmesão na forma de grandes peças (para os comércios varejistas ralarem) tal diferença de populações entre os dois grupos pode ser explicada, pelo menos em parte, pela possível inadequação do manuseio e limpeza nos pontos de ralagem nos supermercados.

Em relação às populações de microrganismos do gênero *Staphylococcus*, houve variação de $1,2 \times 10^3$ a $1,8 \times 10^4$ UFC.g⁻¹ no queijos ralados industrialmente e de $1,2 \times 10^5$ a $8,7 \times 10^6$ UFC.g⁻¹ nos queijos ralados no ato da venda, conforme Tabela 2. Quando comparados estatisticamente, os grupos apresentaram diferenças (teste de Dunn, $p < 0,05$), ou seja, os queijos parmesão ralados industrialmente apresentaram resultados melhores do que os ralados pelos estabelecimentos comerciais. Tal enumeração é de fundamental importância devido à capacidade de mais de 20 espécies do gênero causarem diversas doenças nos seres humanos (VARNAM; EVANS, 1991).

O resultado do presente estudo condiz com pesquisa realizada por Abreu et al (2010b) no Estado de Minas Gerais, onde os autores encontraram populações altas de bactérias do gênero *Staphylococcus* em 18,0 % das amostras analisadas.

Atualmente, não há uma legislação que delimite o máximo de microrganismos do gênero *Staphylococcus* para queijos parmesão no Brasil. Entretanto, a RDC n.º12 (BRASIL, 2001) estabelece limites para os *Staphylococcus* que são produtores da

Tabela 2. População de microrganismos do gênero *Staphylococcus*, médias aritméticas e desvio padrões em cada uma das amostras de queijo ralado tipo parmesão coletadas em estabelecimentos comerciais varejistas no município de Ribeirão Preto, SP, no ano de 2013.

Número da amostra	Ralados Industrialmente					Ralados no Ato da Venda				
	Marca A (UFC.g ⁻¹)	Marca B (UFC.g ⁻¹)	Marca C (UFC.g ⁻¹)	Marca D (UFC.g ⁻¹)	Marca E (UFC.g ⁻¹)	Marca F (UFC.g ⁻¹)	Marca G (UFC.g ⁻¹)	Marca H (UFC.g ⁻¹)		
1	8,9 x 10 ³	1,6 x 10 ⁴	3,1 x 10 ³	5,5 x 10 ³	2,4 x 10 ⁶	6,4 x 10 ⁶	1,2 x 10 ⁶	5,9 x 10 ⁶		
2	2,2 x 10 ³	6,1 x 10 ³	2,1 x 10 ³	1,2 x 10 ³	1,3 x 10 ⁶	2,4 x 10 ⁶	8,5 x 10 ⁵	1,2 x 10 ⁵		
3	3,2 x 10 ³	3,4 x 10 ³	3,8 x 10 ³	2,5 x 10 ³	1,9 x 10 ⁶	2,4 x 10 ⁶	4,4 x 10 ⁵	1,9 x 10 ⁶		
4	6,0 x 10 ³	5,7 x 10 ³	4,2 x 10 ³	8,3 x 10 ³	6,7 x 10 ⁶	4,2 x 10 ⁶	7,9 x 10 ⁵	2,2 x 10 ⁶		
5	2,1 x 10 ³	1,9 x 10 ³	5,7 x 10 ³	3,4 x 10 ³	3,2 x 10 ⁶	1,3 x 10 ⁶	4,8 x 10 ⁶	2,9 x 10 ⁶		
6	5,5 x 10 ³	2,3 x 10 ³	9,2 x 10 ³	3,6 x 10 ³	1,4 x 10 ⁶	1,5 x 10 ⁶	2,3 x 10 ⁶	2,8 x 10 ⁶		
7	8,7 x 10 ³	2,6 x 10 ³	1,6 x 10 ³	8,9 x 10 ³	1,7 x 10 ⁶	4,9 x 10 ⁶	1,8 x 10 ⁶	4,3 x 10 ⁶		
8	3,5 x 10 ³	9,4 x 10 ³	7,2 x 10 ³	1,4 x 10 ⁴	2,5 x 10 ⁶	3,6 x 10 ⁶	5,6 x 10 ⁶	8,9 x 10 ⁵		
9	3,9 x 10 ³	2,2 x 10 ³	4,3 x 10 ³	8,9 x 10 ³	2,2 x 10 ⁶	6,7 x 10 ⁶	2,8 x 10 ⁶	1,2 x 10 ⁶		
10	3,2 x 10 ³	1,8 x 10 ⁴	8,6 x 10 ³	9,4 x 10 ³	1,9 x 10 ⁶	6,9 x 10 ⁶	4,5 x 10 ⁶	4,1 x 10 ⁶		
11	8,9 x 10 ³	9,8 x 10 ³	3,1 x 10 ³	1,9 x 10 ³	4,5 x 10 ⁶	3,9 x 10 ⁶	9,2 x 10 ⁵	5,8 x 10 ⁶		
12	2,2 x 10 ³	1,2 x 10 ⁴	1,2 x 10 ³	2,4 x 10 ³	1,2 x 10 ⁶	1,3 x 10 ⁶	4,6 x 10 ⁶	9,0 x 10 ⁵		
13	3,5 x 10 ³	7,4 x 10 ³	2,3 x 10 ³	1,2 x 10 ³	3,9 x 10 ⁶	2,4 x 10 ⁶	8,2 x 10 ⁶	1,9 x 10 ⁶		
14	6,2 x 10 ³	5,2 x 10 ³	1,5 x 10 ³	3,6 x 10 ³	1,5 x 10 ⁶	3,2 x 10 ⁶	4,3 x 10 ⁶	8,7 x 10 ⁶		
15	3,2 x 10 ³	8,4 x 10 ³	1,9 x 10 ³	4,1 x 10 ³	5,5 x 10 ⁶	5,1 x 10 ⁶	1,4 x 10 ⁶	1,9 x 10 ⁶		
Médias aritméticas e desvio padrão	4,7 x 10 ^{3a} ± 2,4 x 10 ³	7,4 x 10 ^{3a} ± 5,1 x 10 ³	3,9 x 10 ^{3a} ± 2,6 x 10 ³	5,2 x 10 ^{3a} ± 3,7 x 10 ³	2,8 x 10 ^{6b} ± 1,6 x 10 ⁶	3,7 x 10 ^{6b} ± 1,9 x 10 ⁶	2,9 x 10 ^{6b} ± 2,2 x 10 ⁶	3,0 x 10 ^{6b} ± 2,3 x 10 ⁶		

Médias seguidas de letras iguais não diferem do ponto de vista estatístico ao nível de 5% de significância (teste de Dunn)

enzima coagulase, o qual o *Staphylococcus aureus* é o principal exemplar.

De acordo com a RDC n.º12 (BRASIL, 2001), o limite máximo de microrganismos do grupo *Staphylococcus* coagulase positivo, para amostras indicativas de queijos de baixa ou média umidade é de 10^3 UFC.g⁻¹.

A contagem de microrganismos do gênero *Staphylococcus* que são produtores da enzima coagulase variou, no presente estudo, de < 10 a $5,1 \times 10^3$ UFC.g⁻¹ quando ralados industrialmente e < 10 a $3,6 \times 10^6$ UFC.g⁻¹ nos queijos ralados no ato da venda, conforme exposto na Tabela 3. O grupo dos queijos ralados no ato da venda apresentaram amostras com as maiores populações. Das 60 amostras de queijo parmesão raladas no momento da comercialização, 88,3 % apresentaram resultados superiores aos limites pré-estabelecidos pela legislação pertinente, enquanto 16,6 % das raladas industrialmente estavam além desse. Quando comparadas entre si, ou seja, dentro do próprio grupo ralado no ato da venda, as amostras não apresentaram diferenças significativas (teste de Dunn, $p > 0,05$).

O grupo ralado industrial apresentou populações de microrganismos superiores aos níveis máximos pré-estabelecidos pela RDC n.º12 (BRASIL, 2001) em 16,6 % das amostras analisadas, sendo que a maior observada fora de $5,1 \times 10^3$ UFC.g⁻¹. Também, quando comparadas dentro do grupo ralado industrialmente, não foram observadas diferenças (teste de Dunn, $p > 0,05$).

Quando comparados os dois grupos analisados, as marcas B e D (raladas industrialmente) e E (raladas no ato da venda) não se diferenciaram estatisticamente (teste de Dunn, $p > 0,05$). Entretanto, de modo geral, as marcas raladas no ato da venda apresentaram populações maiores do que as raladas industrialmente.

Condizente com o presente estudo, Nogueira, Mariotti e Bueno (2013), na cidade de São José do Rio Preto, SP, analisaram 15 amostras de queijos tipo parmesão ralados industrialmente, sendo que 13,3 % destas apresentaram populações de *Staphylococcus* coagulase positivos superiores a 10^3 UFC.g⁻¹, estando assim em desacordo com a legislação brasileira.

Em estudo semelhante, Abreu et al (2010b) analisaram 24 amostras de queijos parmesão ralados industrialmente adquiridas no Estado de Minas Gerais. Em 18 % dessas amostras, fora obtida populações de *Staphylococcus* coagulase positivos superiores aos permitidos pela legislação.

A origem da contaminação de *Staphylococcus* coagulase positivos pode estar

Tabela 3. População de *Staphylococcus* coagulase positivos, médias aritméticas e desvio padrões em cada uma das amostras de queijos ralados tipo parmesão coletadas em estabelecimentos comerciais varejistas no município de Ribeirão Preto, SP, no ano de 2013.

Número da amostra	Ralados Industrialmente				Ralados no Ato da Venda			
	Marca A (UFC.g ⁻¹)	Marca B (UFC.g ⁻¹)	Marca C (UFC.g ⁻¹)	Marca D (UFC.g ⁻¹)	Marca E (UFC.g ⁻¹)	Marca F (UFC.g ⁻¹)	Marca G (UFC.g ⁻¹)	Marca H (UFC.g ⁻¹)
1	< 1 x 10 ¹	3,2 x 10 ³	< 1 x 10 ¹	1,1 x 10 ³	4,8 x 10 ⁵	2,5 x 10 ⁶	< 1 x 10 ¹	3,5 x 10 ⁶
2	4,4 x 10 ²	< 1 x 10 ¹	< 1 x 10 ¹	4,8 x 10 ²	5,4 x 10 ⁵	9,8 x 10 ⁵	3,4 x 10 ⁵	7,2 x 10 ⁴
3	< 1 x 10 ¹	1,3 x 10 ³	< 1 x 10 ¹	5,0 x 10 ²	< 1 x 10 ¹	1,4 x 10 ⁶	1,7 x 10 ⁵	7,5 x 10 ⁵
4	1,2 x 10 ³	1,1 x 10 ³	< 1 x 10 ¹	3,3 x 10 ³	2,6 x 10 ⁶	8,4 x 10 ⁵	4,7 x 10 ⁵	8,8 x 10 ⁵
5	4,2 x 10 ²	< 1 x 10 ¹	< 1 x 10 ¹	6,8 x 10 ²	1,2 x 10 ⁶	2,6 x 10 ⁵	1,9 x 10 ⁶	1,7 x 10 ⁶
6	1,1 x 10 ³	9,2 x 10 ²	< 1 x 10 ¹	< 1 x 10 ¹	5,7 x 10 ⁵	< 1 x 10 ¹	9,2 x 10 ⁵	1,7 x 10 ⁶
7	< 1 x 10 ¹	< 1 x 10 ¹	< 1 x 10 ¹	< 1 x 10 ¹	7,1 x 10 ⁵	9,8 x 10 ⁵	7,2 x 10 ⁵	1,7 x 10 ⁶
8	< 1 x 10 ¹	1,8 x 10 ³	< 1 x 10 ¹	< 1 x 10 ¹	1,0 x 10 ⁶	1,4 x 10 ⁶	2,2 x 10 ⁶	3,5 x 10 ⁵
9	7,8 x 10 ²	8,8 x 10 ²	< 1 x 10 ¹	< 1 x 10 ¹	9,0 x 10 ⁵	2,6 x 10 ⁶	1,1 x 10 ⁶	7,5 x 10 ⁵
10	< 1 x 10 ¹	< 1 x 10 ¹	< 1 x 10 ¹	< 1 x 10 ¹	7,7 x 10 ⁵	< 1 x 10 ¹	3,6 x 10 ⁶	1,6 x 10 ⁶
11	< 1 x 10 ¹	< 1 x 10 ¹	< 1 x 10 ¹	< 1 x 10 ¹	< 1 x 10 ¹	1,5 x 10 ⁶	1,8 x 10 ⁵	3,4 x 10 ⁶
12	< 1 x 10 ¹	5,1 x 10 ³	< 1 x 10 ¹	4,8 x 10 ²	7,3 x 10 ⁵	2,5 x 10 ⁵	1,8 x 10 ⁶	5,4 x 10 ⁵
13	< 1 x 10 ¹	< 1 x 10 ¹	< 1 x 10 ¹	< 1 x 10 ¹	1,5 x 10 ⁶	1,4 x 10 ⁶	3,2 x 10 ⁶	1,1 x 10 ⁶
14	< 1 x 10 ¹	< 1 x 10 ¹	< 1 x 10 ¹	< 1 x 10 ¹	9,2 x 10 ⁵	6,4 x 10 ⁵	< 1 x 10 ¹	1,7 x 10 ⁶
15	< 1 x 10 ¹	< 1 x 10 ¹	< 1 x 10 ¹	1,6 x 10 ³	< 1 x 10 ¹	1,0 x 10 ⁶	5,6 x 10 ⁵	7,7 x 10 ⁵
Médias aritméticas e desvio padrão	2,6 x 10 ^{2c} ± 4,3 x 10 ²	9,6 x 10 ^{2bc} ± 1,4 x 10 ³	< 1 x 10 ^c	5,7 x 10 ^{2bc} ± 9,1 x 10 ²	8,1 x 10 ^{5ab} ± 6,8 x 10 ⁵	1,0 x 10 ^{6a} ± 8,1 x 10 ⁵	1,1 x 10 ^{6a} ± 1,1 x 10 ⁶	1,3 x 10 ^{6a} ± 1,0 x 10 ⁶

Médias seguidas de letras iguais não diferem do ponto de vista estatístico ao nível de 5% de significância (teste de Dunn)

relacionada à baixa qualidade da matéria prima, na falta de higienização de equipamentos e utensílios e na falta de higiene pessoal (NOGUEIRA; MARIOTTI; BUENO, 2013).

Comparando os resultados entre os dois grupos analisados (ralados industrialmente e no ato da venda), evidencia-se um déficit no quesito limpeza de equipamentos ou falta de higiene pessoal no grupo dos queijos que são ralados pelos estabelecimentos comerciais, visto que o queijo ralado pela indústria e o queijo que é vendido em peças grandes para ralagem, possivelmente advém de matérias primas de qualidade semelhante pelo fato de serem inspecionadas por órgãos fiscalizadores.

Na Tabela 4, é mostrado o exponencial das populações de *Staphylococcus* coagulase positivos para melhor visualização das diferenças encontradas entre os dois grupos analisados.

Tabela 4. Exponencial das populações de *Staphylococcus* coagulase positivos em cada uma das marcas de queijos ralados tipo parmesão coletadas em estabelecimentos comerciais varejistas no município de Ribeirão Preto, SP, no ano de 2013

(Pop. UFC.g ⁻¹)	Ralados Industrialmente				Ralados no Ato da Venda			
	Marca A (Nº de amostras)	Marca B (Nº de amostras)	Marca C (Nº de amostras)	Marca D (Nº de amostras)	Marca E (Nº de amostras)	Marca F (Nº de amostras)	Marca G (Nº de amostras)	Marca H (Nº de amostras)
< 10	10 (67%)	8 (53%)	15 (100%)	8 (53%)	3 (20%)	2 (13%)	2 (13%)	0
10 ¹	0	0	0	0	0	0	0	0
10 ²	3 (20%)	2 (13%)	0	4 (27%)	0	0	0	0
10 ³	2 (13%)	5 (33%)	0	3 (20%)	0	0	0	0
10 ⁴	0	0	0	0	0	0	0	0
10 ⁵	0	0	0	0	8 (54%)	6 (40%)	7 (47%)	7 (47%)
10 ⁶	0	0	0	0	4 (27%)	7 (47%)	6 (40%)	8 (53%)
Total de Amostras	15 (100%)	15 (100%)	15 (100%)	15 (100%)	15 (100%)	15 (100%)	15 (100%)	15 (100%)

Dentre as espécies de *Staphylococcus* produtoras da enzima coagulase, uma das mais recorrentes em surtos envolvendo alimentos é o *S. aureus*. Na Tabela 5 são mostradas as populações de *S. aureus* em cada uma das amostras analisadas.

Tabela 5. População de *Staphylococcus aureus*, médias aritméticas e desvio padrões em cada uma das amostras de queijo ralado tipo parmesão coletadas em estabelecimentos comerciais varejistas no município de Ribeirão Preto, SP, no ano de 2013.

Número da amostra	Ralados Industrialmente						Ralados no Ato da Venda					
	Marca A (UFC.g ⁻¹)	Marca B (UFC.g ⁻¹)	Marca C (UFC.g ⁻¹)	Marca D (UFC.g ⁻¹)	Marca E (UFC.g ⁻¹)	Marca F (UFC.g ⁻¹)	Marca G (UFC.g ⁻¹)	Marca H (UFC.g ⁻¹)	Marca I (UFC.g ⁻¹)	Marca J (UFC.g ⁻¹)	Marca K (UFC.g ⁻¹)	
1	< 1 x 10	3,2 x 10 ³	< 1 x 10	1,1 x 10 ³	4,8 x 10 ⁵	2,5 x 10 ⁶	< 1 x 10	3,5 x 10 ⁶				
2	4,4 x 10 ²	< 1 x 10	< 1 x 10	4,8 x 10 ²	5,4 x 10 ⁵	9,8 x 10 ⁵	3,4 x 10 ⁵	7,2 x 10 ⁴				
3	< 1 x 10	1,3 x 10 ³	< 1 x 10	5,0 x 10 ²	< 1 x 10	1,4 x 10 ⁶	1,7 x 10 ⁵	7,5 x 10 ⁵				
4	1,2 x 10 ³	1,1 x 10 ³	< 1 x 10	< 1 x 10	2,6 x 10 ⁶	< 1 x 10	3,1 x 10 ⁵	8,8 x 10 ⁵				
5	4,2 x 10 ²	< 1 x 10	< 1 x 10	6,8 x 10 ²	1,2 x 10 ⁶	2,6 x 10 ⁵	1,9 x 10 ⁶	1,7 x 10 ⁶				
6	1,1 x 10 ³	9,2 x 10 ²	< 1 x 10	< 1 x 10	5,7 x 10 ⁵	< 1 x 10	9,2 x 10 ⁵	1,7 x 10 ⁶				
7	< 1 x 10	< 1 x 10	< 1 x 10	< 1 x 10	7,1 x 10 ⁵	9,8 x 10 ⁵	7,2 x 10 ⁵	1,7 x 10 ⁶				
8	< 1 x 10	1,8 x 10 ³	< 1 x 10	< 1 x 10	1,0 x 10 ⁶	1,4 x 10 ⁶	1,1 x 10 ⁶	3,5 x 10 ⁵				
9	7,8 x 10 ²	8,8 x 10 ²	< 1 x 10	< 1 x 10	9,0 x 10 ⁵	2,6 x 10 ⁶	1,1 x 10 ⁶	7,5 x 10 ⁵				
10	< 1 x 10	< 1 x 10	< 1 x 10	< 1 x 10	7,7 x 10 ⁵	< 1 x 10	3,6 x 10 ⁶	1,6 x 10 ⁶				
11	< 1 x 10	< 1 x 10	< 1 x 10	< 1 x 10	< 1 x 10	1,5 x 10 ⁶	1,8 x 10 ⁵	3,4 x 10 ⁶				
12	< 1 x 10	5,1 x 10 ³	< 1 x 10	4,8 x 10 ²	7,3 x 10 ⁵	2,5 x 10 ⁵	1,8 x 10 ⁶	5,4 x 10 ⁵				
13	< 1 x 10	< 1 x 10	< 1 x 10	< 1 x 10	7,9 x 10 ⁵	1,4 x 10 ⁶	3,2 x 10 ⁶	1,1 x 10 ⁶				
14	< 1 x 10	< 1 x 10	< 1 x 10	< 1 x 10	3,0 x 10 ⁵	6,4 x 10 ⁵	< 1 x 10	1,7 x 10 ⁶				
15	< 1 x 10	< 1 x 10	< 1 x 10	1,6 x 10 ³	< 1 x 10	1,0 x 10 ⁶	5,6 x 10 ⁵	7,7 x 10 ⁵				
Médias aritméticas e desvio padrão	2,6 x 10 ^{2a} ± 4,3 x 10 ²	9,6 x 10 ^{2a} ± 1,4 x 10 ³	< 1 x 10 ^a	3,5 x 10 ^{2a} ± 4,9 x 10 ²	7,1 x 10 ^{5b} ± 6,6 x 10 ⁵	1,0 x 10 ^{6b} ± 8,6 x 10 ⁵	1,0 x 10 ^{6b} ± 1,1 x 10 ⁶	1,3 x 10 ^{6b} ± 1,0 x 10 ⁶				

Médias seguidas de letras iguais não diferem do ponto de vista estatístico ao nível de 5% de significância (teste de Dunn)

Tal bactéria apresentou populações no presente estudo variando de < 10 a $5,1 \times 10^3$ UFC.g⁻¹ quando ralados industrialmente e de < 10 a $3,6 \times 10^6$ UFC.g⁻¹ quando raladas no momento da venda.

Os grupos ralados industrializados e no ato da venda apresentaram populações superiores a 10^3 UFC.g⁻¹, em 15,0 % e 86,6 % das amostras analisadas, respectivamente. Quando analisadas estatisticamente, as médias dos rankings dos grupos, todas as amostras dos queijos tipo parmesão ralados industrialmente se diferenciaram das amostras raladas pelos comércios (teste de Dunn, $p < 0,05$). Sendo assim, pode-se inferir que a qualidade microbiológica das amostras analisadas, quando comparada às populações de *S. aureus*, é significativamente inferior no produto ralado no ato da venda, o que pode acarretar em um perigo a saúde de quem os consumir.

Os resultados obtidos por Salvador et al (2001) reafirmam o potencial risco a saúde pública, visto que 40,0 % das amostras de queijos tipo parmesão raladas industrialmente analisadas pelo citado autor apresentaram populações de *S. aureus* superiores 10^3 UFC.g⁻¹.

As populações de *S. aureus* encontradas em queijos parmesão ralados pelos comércios podem ser provenientes da má higienização dos equipamentos, tais como raladores e outros, ou da higiene inadequada por parte dos funcionários responsáveis pela ralagem do mesmo, já que esta bactéria está presente em mais de 50,0 % da população humana (BERGDOLL; BENNETT, 1989). Apesar do percentual alto de pessoas que albergam tal microrganismo, medidas devem ser adotadas para que o mesmo não atinja populações elevadas, como a correta higienização das mãos e equipamentos, uso de luvas e toucas. Para queijos ralados no ato da venda, espera-se uma maior manipulação do que em queijos previamente ralados, o que pode ocasionar maiores chances de contaminação.

Ainda, algumas características físicas e químicas dos queijos tipo parmesão podem auxiliar no aumento de populações de *S. aureus*. De acordo com Pimentel et al. (2002), a atividade de água (aw) do queijo ralado varia de 0,58 a 0,89. Essa baixa aw favorece a multiplicação de alguns microrganismos, dentre eles o *S. aureus*, que pode se desenvolver em aw de até 0,86. Outro fator que pode auxiliar na multiplicação deste microrganismo é a quantidade de bolores e leveduras presentes nos queijos, evidenciadas da Tabela 6. Estes, quando presentes em populações elevadas, podem reduzir a quantidade de ácido láctico, o que favorece o

Tabela 6. População de bolores e leveduras, médias aritméticas e desvio padrões em cada uma das amostras de queijo ralado tipo parmesão coletadas em estabelecimentos comerciais varejistas no município de Ribeirão Preto, SP, no ano de 2013.

Número da amostra	Ralados Industrialmente						Ralados no Ato da Venda									
	Marca A (UFC.g ⁻¹)	Marca B (UFC.g ⁻¹)	Marca C (UFC.g ⁻¹)	Marca D (UFC.g ⁻¹)	Marca E (UFC.g ⁻¹)	Marca F (UFC.g ⁻¹)	Marca G (UFC.g ⁻¹)	Marca H (UFC.g ⁻¹)	Marca A (UFC.g ⁻¹)	Marca B (UFC.g ⁻¹)	Marca C (UFC.g ⁻¹)	Marca D (UFC.g ⁻¹)	Marca E (UFC.g ⁻¹)	Marca F (UFC.g ⁻¹)	Marca G (UFC.g ⁻¹)	Marca H (UFC.g ⁻¹)
1	< 1 x 10	4,0 x 10 ³	1,0 x 10 ³	8,0 x 10 ²	1,5 x 10 ⁵	1,9 x 10 ⁴	8,2 x 10 ⁴	8,4 x 10 ⁵	< 1 x 10	4,0 x 10 ³	1,0 x 10 ³	8,0 x 10 ²	1,5 x 10 ⁵	1,9 x 10 ⁴	8,2 x 10 ⁴	8,4 x 10 ⁵
2	2,0 x 10 ²	1,4 x 10 ³	< 1 x 10	3,0 x 10 ²	8,5 x 10 ⁴	8,0 x 10 ³	7,9 x 10 ⁴	4,0 x 10 ²	2,0 x 10 ²	1,4 x 10 ³	< 1 x 10	3,0 x 10 ²	8,5 x 10 ⁴	8,0 x 10 ³	7,9 x 10 ⁴	4,0 x 10 ²
3	< 1 x 10	1,1 x 10 ³	2,0 x 10 ²	3,0 x 10 ²	1,1 x 10 ⁵	9,0 x 10 ³	4,1 x 10 ⁴	3,3 x 10 ⁵	1,1 x 10 ³	1,1 x 10 ³	2,0 x 10 ²	3,0 x 10 ²	1,1 x 10 ⁵	9,0 x 10 ³	4,1 x 10 ⁴	3,3 x 10 ⁵
4	< 1 x 10	< 1 x 10	< 1 x 10	1,0 x 10 ²	1,2 x 10 ⁶	1,2 x 10 ⁵	1,4 x 10 ⁵	1,4 x 10 ⁵	< 1 x 10	< 1 x 10	< 1 x 10	1,0 x 10 ²	1,2 x 10 ⁶	1,2 x 10 ⁵	1,4 x 10 ⁵	1,4 x 10 ⁵
5	< 1 x 10	2,4 x 10 ³	2,0 x 10 ²	< 1 x 10	7,9 x 10 ⁵	< 1 x 10	1,1 x 10 ⁵	1,8 x 10 ⁵	2,4 x 10 ³	2,4 x 10 ³	< 1 x 10	< 1 x 10	7,9 x 10 ⁵	< 1 x 10	1,1 x 10 ⁵	1,8 x 10 ⁵
6	< 1 x 10	8,0 x 10 ²	< 1 x 10	4,0 x 10 ²	2,4 x 10 ⁵	5,0 x 10 ³	2,4 x 10 ⁵	9,0 x 10 ⁴	8,0 x 10 ²	8,0 x 10 ²	< 1 x 10	4,0 x 10 ²	2,4 x 10 ⁵	5,0 x 10 ³	2,4 x 10 ⁵	9,0 x 10 ⁴
7	1,0 x 10 ²	7,0 x 10 ²	5,0 x 10 ²	1,4 x 10 ³	3,2 x 10 ⁵	8,3 x 10 ⁵	1,8 x 10 ⁵	2,3 x 10 ⁵	7,0 x 10 ²	7,0 x 10 ²	5,0 x 10 ²	1,4 x 10 ³	3,2 x 10 ⁵	8,3 x 10 ⁵	1,8 x 10 ⁵	2,3 x 10 ⁵
8	< 1 x 10	8,0 x 10 ²	3,0 x 10 ²	1,9 x 10 ³	1,8 x 10 ⁶	4,0 x 10 ³	7,5 x 10 ⁵	1,4 x 10 ⁵	8,0 x 10 ²	8,0 x 10 ²	3,0 x 10 ²	1,9 x 10 ³	1,8 x 10 ⁶	4,0 x 10 ³	7,5 x 10 ⁵	1,4 x 10 ⁵
9	< 1 x 10	2,1 x 10 ³	2,0 x 10 ³	1,7 x 10 ³	1,6 x 10 ⁶	4,0 x 10 ⁴	2,5 x 10 ⁵	1,1 x 10 ⁵	2,1 x 10 ³	2,1 x 10 ³	2,0 x 10 ³	1,7 x 10 ³	1,6 x 10 ⁶	4,0 x 10 ⁴	2,5 x 10 ⁵	1,1 x 10 ⁵
10	1,0 x 10 ²	1,8 x 10 ³	4,0 x 10 ²	1,2 x 10 ³	6,8 x 10 ⁴	1,2 x 10 ⁴	1,9 x 10 ⁵	3,9 x 10 ⁵	1,8 x 10 ³	1,8 x 10 ³	4,0 x 10 ²	1,2 x 10 ³	6,8 x 10 ⁴	1,2 x 10 ⁴	1,9 x 10 ⁵	3,9 x 10 ⁵
11	1,0 x 10 ²	5,0 x 10 ²	2,0 x 10 ³	4,0 x 10 ²	1,4 x 10 ⁵	9,0 x 10 ⁴	9,0 x 10 ²	5,8 x 10 ⁵	5,0 x 10 ²	5,0 x 10 ²	2,0 x 10 ³	4,0 x 10 ²	1,4 x 10 ⁵	9,0 x 10 ⁴	9,0 x 10 ²	5,8 x 10 ⁵
12	< 1 x 10	2,5 x 10 ³	2,0 x 10 ²	< 1 x 10	1,3 x 10 ⁵	< 1 x 10	2,3 x 10 ⁵	7,0 x 10 ³	2,5 x 10 ³	2,5 x 10 ³	2,0 x 10 ²	< 1 x 10	1,3 x 10 ⁵	< 1 x 10	2,3 x 10 ⁵	7,0 x 10 ³
13	< 1 x 10	2,0 x 10 ²	< 1 x 10	< 1 x 10	1,3 x 10 ⁵	1,2 x 10 ⁴	8,9 x 10 ⁵	8,7 x 10 ⁴	2,0 x 10 ²	2,0 x 10 ²	< 1 x 10	< 1 x 10	1,3 x 10 ⁵	1,2 x 10 ⁴	8,9 x 10 ⁵	8,7 x 10 ⁴
14	< 1 x 10	9,0 x 10 ²	3,0 x 10 ²	6,0 x 10 ²	1,0 x 10 ³	9,0 x 10 ³	2,3 x 10 ⁵	1,4 x 10 ⁶	9,0 x 10 ²	9,0 x 10 ²	3,0 x 10 ²	6,0 x 10 ²	1,0 x 10 ³	9,0 x 10 ³	2,3 x 10 ⁵	1,4 x 10 ⁶
15	< 1 x 10	8,0 x 10 ²	1,0 x 10 ³	8,0 x 10 ²	1,0 x 10 ³	8,0 x 10 ⁴	9,0 x 10 ⁴	2,4 x 10 ⁵	8,0 x 10 ²	8,0 x 10 ²	1,0 x 10 ³	8,0 x 10 ²	1,0 x 10 ³	8,0 x 10 ⁴	9,0 x 10 ⁴	2,4 x 10 ⁵
Médias aritméticas e desvio padrão	3,3 x 10 ^{1c} ± 6,2 x 10 ¹	1,3 x 10 ^{3bc} ± 1,0 x 10 ³	5,4 x 10 ^{2bc} ± 6,3 x 10 ²	6,6 x 10 ^{2bc} ± 6,2 x 10 ²	4,6 x 10 ^{5a} ± 6,2 x 10 ⁵	8,2 x 10 ^{4ab} ± 2,1 x 10 ⁵	2,3 x 10 ^{5a} ± 2,5 x 10 ⁵	3,1 x 10 ^{5a} ± 3,7 x 10 ⁵	3,3 x 10 ^{1c} ± 6,2 x 10 ¹	1,3 x 10 ^{3bc} ± 1,0 x 10 ³	5,4 x 10 ^{2bc} ± 6,3 x 10 ²	6,6 x 10 ^{2bc} ± 6,2 x 10 ²	4,6 x 10 ^{5a} ± 6,2 x 10 ⁵	8,2 x 10 ^{4ab} ± 2,1 x 10 ⁵	2,3 x 10 ^{5a} ± 2,5 x 10 ⁵	3,1 x 10 ^{5a} ± 3,7 x 10 ⁵

Médias seguidas de letras iguais não diferem do ponto de vista estatístico ao nível de 5% de significância (teste de Dunn)

desenvolvimento de bactérias potencialmente patogênicas, como o próprio *S. aureus* (BULLERMAN, 1980).

No grupo dos queijos ralados industrialmente houve variação de < 10 a $4,0 \times 10^3$ UFC.g⁻¹ e no grupo dos ralados no ato da venda < 10 a $1,8 \times 10^6$ UFC.g⁻¹.

Estatisticamente, quando comparadas todas as médias dos rankings das populações, a marca F (ralada no ato da venda), não diferiu das marcas raladas industrialmente. As demais amostras apresentaram médias dos rankings que diferiram significativamente entre si (teste de Dunn, $p < 0,05$).

Quando comparadas as populações de bolores e leveduras, pode-se dizer que os queijos ralados industrialmente possuem melhor qualidade microbiológica do que os ralados no ato da venda.

Não há um consenso nos resultados quando comparadas as populações de bolores e leveduras encontradas em pesquisas semelhantes realizadas. No presente trabalho foram encontradas populações superiores a 10^3 UFC.g⁻¹ em 25,0 % das amostras analisadas de queijos tipo parmesão ralados industrialmente. Salvador et al (2001), em trabalho realizado na cidade de Caxias do Sul, RS, encontrou populações superiores a 10^3 UFC.g⁻¹ em 60,0 % das amostras analisadas. Abreu et al (2010b), por sua vez, analisando o mesmo tipo de produto no Estado de Minas Gerais, encontrou 32,0 % de amostras com contagens maiores que 10^3 UFC.g⁻¹.

Enfatiza-se que populações elevadas de fungos podem indicar que o produto possa estar em estado de deterioração, porém ainda não visível. Ressalta-se ainda que algumas espécies de fungos filamentosos sejam produtoras de micotoxinas, que são substâncias potencialmente carcinogênicas (FRAZIER; WESTHOFF, 1993), o que pode desencadear graves problemas.

Segundo Abreu et al (2010b), os principais microrganismos beneficiados pela baixa atividade de água (a_w) são os fungos filamentosos, o que pode explicar, em parte, as altas populações encontradas. Ainda, a produção do alimento em baixas condições higiênicas, processamento inadequado e matéria-prima de qualidade inferior, pode propiciar a multiplicação desses microrganismos (MATTAR et al, 2011).

Entretanto, alguns fatores também possuem efeitos contrários à multiplicação de bolores e leveduras. De acordo com Trombete, Fraga e Saldanha (2012), 100,0

% das amostras analisadas por eles, indicaram a presença de conservante ácido sórbico. O uso de sais do ácido sórbico em queijos e derivados lácteos é comumente realizado pelos fabricantes, já que apresenta eficiente inibição de fungos com consequente aumento na vida de prateleira do produto (THERON; LUES, 2007; COMA, 2008, SALAVESSA, 2009). Todavia, apesar desse efeito inibitório constatado pelos autores, as populações permaneceram altas nas amostras analisadas, principalmente no grupo ralado no ato da venda, o que pode indicar uma possível contaminação devido à manipulação inadequada nos pontos de comercialização.

Nos queijos no ato da venda, verifica-se que 90,0 % das amostras apresentaram resultados superiores a 10^3 UFC.g⁻¹. Não se pode dizer com exatidão qual a origem da alta contaminação encontrada, pois tais microrganismos podem ser provenientes de diversas fontes como já mencionado. Entretanto, medidas devem ser elaboradas para que os queijos ralados no ato da venda tenham uma diminuição na contaminação por estes microrganismos, visando uma melhor qualidade microbiológica e minimizando os riscos potenciais que estes podem trazer a saúde humana.

Os resultados relativos à população de coliformes totais estão presentes na Tabela 7.

Tabela 7. População de coliformes totais (Pop. NMP.g⁻¹) em cada uma das amostras de queijo ralado tipo parmesão coletadas em estabelecimentos comerciais varejistas no município de Ribeirão Preto, SP, no ano de 2013.

Número da amostra	Ralados Industrialmente				Ralados no Ato da Venda			
	Marca A (NMP.g ⁻¹)	Marca B (NMP.g ⁻¹)	Marca C (NMP.g ⁻¹)	Marca D (NMP.g ⁻¹)	Marca E (NMP.g ⁻¹)	Marca F (NMP.g ⁻¹)	Marca G (NMP.g ⁻¹)	Marca H (NMP.g ⁻¹)
1	< 0,3 x 10	0,4 x 10 ¹	< 0,3 x 10	< 0,3 x 10	< 0,3 x 10	< 0,3 x 10	< 0,3 x 10	7,0 x 10 ¹
2	< 0,3 x 10	< 0,3 x 10	< 0,3 x 10	< 0,3 x 10	< 0,3 x 10	0,4 x 10 ¹	< 0,3 x 10	< 0,3 x 10
3	< 0,3 x 10	0,4 x 10 ¹	< 0,3 x 10	< 0,3 x 10	< 0,3 x 10	4,0 x 10 ¹	< 0,3 x 10	< 0,3 x 10
4	< 0,3 x 10	0,4 x 10 ¹	< 0,3 x 10	< 0,3 x 10	5,0 x 10 ²	0,4 x 10	0,4 x 10 ¹	< 0,3 x 10
5	< 0,3 x 10	< 0,3 x 10	< 0,3 x 10	< 0,3 x 10	4,0 x 10 ¹	< 0,3 x 10	< 0,3 x 10	1,5 x 10 ¹
6	< 0,3 x 10	< 0,3 x 10	< 0,3 x 10	0,4 x 10 ¹	< 0,3 x 10	7,0 x 10 ¹	4,0 x 10 ¹	< 0,3 x 10
7	< 0,3 x 10	< 0,3 x 10	< 0,3 x 10	< 0,3 x 10	< 0,3 x 10	1,5 x 10 ¹	< 0,3 x 10	< 0,3 x 10
8	< 0,3 x 10	< 0,3 x 10	< 0,3 x 10	2,1 x 10 ²	< 0,3 x 10	< 0,3 x 10	0,4 x 10 ¹	7,0 x 10 ¹
9	< 0,3 x 10	< 0,3 x 10	< 0,3 x 10	< 0,3 x 10	< 0,3 x 10	< 0,3 x 10	< 0,3 x 10	0,4 x 10 ¹
10	< 0,3 x 10	< 0,3 x 10	< 0,3 x 10	0,4 x 10 ¹	< 0,3 x 10	< 0,3 x 10	4,0 x 10 ¹	< 0,3 x 10
11	< 0,3 x 10	< 0,3 x 10	< 0,3 x 10	< 0,3 x 10	< 0,3 x 10	< 0,3 x 10	< 0,3 x 10	0,9 x 10 ¹
12	< 0,3 x 10	< 0,3 x 10	< 0,3 x 10	< 0,3 x 10	< 0,3 x 10	< 0,3 x 10	< 0,3 x 10	9,0 x 10 ¹
13	< 0,3 x 10	< 0,3 x 10	< 0,3 x 10	< 0,3 x 10	< 0,3 x 10	< 0,3 x 10	1,5 x 10 ¹	4,0 x 10 ¹
14	< 0,3 x 10	< 0,3 x 10	< 0,3 x 10	< 0,3 x 10	< 0,3 x 10	< 0,3 x 10	< 0,3 x 10	2,1 x 10 ²
15	< 0,3 x 10	< 0,3 x 10	< 0,3 x 10	< 0,3 x 10	< 0,3 x 10	4,0 x 10 ¹	< 0,3 x 10	< 0,3 x 10

Quando analisados os dois grupos, ralados industrialmente e ralado no ato da venda, as populações de coliformes totais variaram de < 3 a $5,0 \times 10^2$ NMP.g⁻¹. Das 60 amostras raladas industrialmente, 6 (10,0 %) continham coliformes totais. Com relação às amostras raladas no ato da venda, 21 (35,0 %) continham tal grupo bacteriano. Assim, quando comparadas às quantidades de amostras positivas e negativas para a presença do determinado grupo bacteriano através do teste de qui-quadrado, constataram-se diferenças significativas ($p < 0,01$). Portanto, pode-se inferir que a probabilidade de ingestão de coliformes totais ao consumir queijos ralados no ato da venda é 99,0 % maior que a de consumir queijos ralados industrialmente.

Em pesquisa realizada por Salvador et al (2001), os mesmos encontraram populações variando de < 3 a $1,4 \times 10^2$ NMP.g⁻¹. Outros autores encontraram resultados diferentes. Nogueira, Mariotti e Bueno (2013), encontraram em 6,6 % das amostras analisadas, populações variando de < 3 a $1,0 \times 10^3$ NMP.g⁻¹, o que já pode indicar um risco maior de albergar bactérias patogênicas.

As informações contidas na Tabela 8 referem-se às populações de coliformes termotolerantes encontradas nas amostras analisadas.

Tabela 8. População de coliformes termotolerantes (NMP.g⁻¹) em cada uma das amostras de queijo ralado tipo parmesão coletadas em estabelecimentos comerciais varejistas no município de Ribeirão Preto, SP, no ano de 2013.

Número da amostra	Ralados Industrialmente				Ralados no Ato da Venda			
	Marca A (NMP.g ⁻¹)	Marca B (NMP.g ⁻¹)	Marca C (NMP.g ⁻¹)	Marca D (NMP.g ⁻¹)	Marca E (NMP.g ⁻¹)	Marca F (NMP.g ⁻¹)	Marca G (NMP.g ⁻¹)	Marca H (NMP.g ⁻¹)
1	< 0,3 x 10	< 0,3 x 10	< 0,3 x 10	< 0,3 x 10	< 0,3 x 10	< 0,3 x 10	< 0,3 x 10	0,4 x 10
2	< 0,3 x 10	< 0,3 x 10	< 0,3 x 10	< 0,3 x 10	< 0,3 x 10	< 0,3 x 10	< 0,3 x 10	< 0,3 x 10
3	< 0,3 x 10	< 0,3 x 10	< 0,3 x 10	< 0,3 x 10	< 0,3 x 10	0,4 x 10	< 0,3 x 10	< 0,3 x 10
4	< 0,3 x 10	< 0,3 x 10	< 0,3 x 10	< 0,3 x 10	4,0 x 10	< 0,3 x 10	< 0,3 x 10	< 0,3 x 10
5	< 0,3 x 10	< 0,3 x 10	< 0,3 x 10	< 0,3 x 10	4,0 x 10	< 0,3 x 10	< 0,3 x 10	< 0,3 x 10
6	< 0,3 x 10	< 0,3 x 10	< 0,3 x 10	< 0,3 x 10	< 0,3 x 10	1,5 x 10	1,5 x 10	< 0,3 x 10
7	< 0,3 x 10	< 0,3 x 10	< 0,3 x 10	< 0,3 x 10	< 0,3 x 10	< 0,3 x 10	< 0,3 x 10	< 0,3 x 10
8	< 0,3 x 10	< 0,3 x 10	< 0,3 x 10	7,0 x 10	< 0,3 x 10	< 0,3 x 10	< 0,3 x 10	< 0,3 x 10
9	< 0,3 x 10	< 0,3 x 10	< 0,3 x 10	< 0,3 x 10	< 0,3 x 10	< 0,3 x 10	< 0,3 x 10	< 0,3 x 10
10	< 0,3 x 10	< 0,3 x 10	< 0,3 x 10	< 0,3 x 10	< 0,3 x 10	< 0,3 x 10	2,0 x 10	< 0,3 x 10
11	< 0,3 x 10	< 0,3 x 10	< 0,3 x 10	< 0,3 x 10	< 0,3 x 10	< 0,3 x 10	< 0,3 x 10	< 0,3 x 10
12	< 0,3 x 10	< 0,3 x 10	< 0,3 x 10	< 0,3 x 10	< 0,3 x 10	< 0,3 x 10	< 0,3 x 10	< 0,3 x 10
13	< 0,3 x 10	< 0,3 x 10	< 0,3 x 10	< 0,3 x 10	< 0,3 x 10	< 0,3 x 10	0,4 x 10	< 0,3 x 10
14	< 0,3 x 10	< 0,3 x 10	< 0,3 x 10	< 0,3 x 10	< 0,3 x 10	< 0,3 x 10	< 0,3 x 10	1,5 x 10
15	< 0,3 x 10	< 0,3 x 10	< 0,3 x 10	< 0,3 x 10	< 0,3 x 10	1,5 x 10	< 0,3 x 10	< 0,3 x 10

Como observado nos dados apresentados, foram encontrados coliformes termotolerantes em ambos os grupos. Nos queijos parmesão ralados industrialmente, foi encontrado apenas uma amostra (1,6 %), da marca D, com população de $7,0 \times 10^1$ NMP.g⁻¹. Já no grupo dos ralados no ato da venda, dez amostras (16,6 %), pelo menos duas de cada marca, apresentaram-se positivas para tal grupo, o que pode indicar uma maior possibilidade de presença de bactérias patogênicas de origem fecal. Quando analisadas estatisticamente, o grupo ralado industrialmente diferiu-se do ralado no ato da venda (teste de qui-quadrado, $p < 0,01$), o que sugere uma probabilidade menor de ingestão de coliformes termotolerantes quando consumido queijos do primeiro grupo.

De acordo com a RDC n.º12 (BRASIL, 2001), o limite máximo, para amostras indicativas, de coliformes termotolerantes em queijos parmesão ralados é de 5×10^2 NMP.g⁻¹. Assim, 100,0 % dos queijos analisados encontram-se de acordo com a legislação estabelecida, não acarretando assim problemas em sua comercialização.

Dentre as bactérias do grupo coliformes termotolerantes, uma das principais representantes e que possui fundamental importância no âmbito da saúde pública devido a sua patogenicidade é a *Escherichia coli*. Os resultados exibidos na Tabela 9 referem-se às populações de *E. coli* encontradas nas amostras analisadas.

Tabela 9. População de *E. coli* (Pop. NMP.g⁻¹) em cada uma das amostras de queijo ralado tipo parmesão coletadas em estabelecimentos comerciais varejistas no município de Ribeirão Preto, SP, no ano de 2013.

Número da amostra	Ralados Industrialmente				Ralados no Ato da Venda			
	Marca A (NMP.g ⁻¹)	Marca B (NMP.g ⁻¹)	Marca C (NMP.g ⁻¹)	Marca D (NMP.g ⁻¹)	Marca E (NMP.g ⁻¹)	Marca F (NMP.g ⁻¹)	Marca G (NMP.g ⁻¹)	Marca H (NMP.g ⁻¹)
1	< 0,3 x 10	< 0,3 x 10	< 0,3 x 10	< 0,3 x 10	< 0,3 x 10	< 0,3 x 10	< 0,3 x 10	0,4 x 10
2	< 0,3 x 10	< 0,3 x 10	< 0,3 x 10	< 0,3 x 10	< 0,3 x 10	< 0,3 x 10	< 0,3 x 10	< 0,3 x 10
3	< 0,3 x 10	< 0,3 x 10	< 0,3 x 10	< 0,3 x 10	< 0,3 x 10	0,4 x 10	< 0,3 x 10	< 0,3 x 10
4	< 0,3 x 10	< 0,3 x 10	< 0,3 x 10	< 0,3 x 10	2,3 x 10	< 0,3 x 10	< 0,3 x 10	< 0,3 x 10
5	< 0,3 x 10	< 0,3 x 10	< 0,3 x 10	< 0,3 x 10	2,3 x 10	< 0,3 x 10	< 0,3 x 10	< 0,3 x 10
6	< 0,3 x 10	< 0,3 x 10	< 0,3 x 10	< 0,3 x 10	< 0,3 x 10	0,4 x 10	1,5 x 10	< 0,3 x 10
7	< 0,3 x 10	< 0,3 x 10	< 0,3 x 10	< 0,3 x 10	< 0,3 x 10	< 0,3 x 10	< 0,3 x 10	< 0,3 x 10
8	< 0,3 x 10	< 0,3 x 10	< 0,3 x 10	7,0 x 10	< 0,3 x 10	< 0,3 x 10	< 0,3 x 10	< 0,3 x 10
9	< 0,3 x 10	< 0,3 x 10	< 0,3 x 10	< 0,3 x 10	< 0,3 x 10	< 0,3 x 10	< 0,3 x 10	< 0,3 x 10
10	< 0,3 x 10	< 0,3 x 10	< 0,3 x 10	< 0,3 x 10	< 0,3 x 10	< 0,3 x 10	1,5 x 10	< 0,3 x 10
11	< 0,3 x 10	< 0,3 x 10	< 0,3 x 10	< 0,3 x 10	< 0,3 x 10	< 0,3 x 10	< 0,3 x 10	< 0,3 x 10
12	< 0,3 x 10	< 0,3 x 10	< 0,3 x 10	< 0,3 x 10	< 0,3 x 10	< 0,3 x 10	< 0,3 x 10	< 0,3 x 10
13	< 0,3 x 10	< 0,3 x 10	< 0,3 x 10	< 0,3 x 10	< 0,3 x 10	< 0,3 x 10	0,4 x 10	< 0,3 x 10
14	< 0,3 x 10	< 0,3 x 10	< 0,3 x 10	< 0,3 x 10	< 0,3 x 10	< 0,3 x 10	< 0,3 x 10	1,5 x 10
15	< 0,3 x 10	< 0,3 x 10	< 0,3 x 10	< 0,3 x 10	< 0,3 x 10	0,4 x 10	< 0,3 x 10	< 0,3 x 10

As populações de *E. coli* variaram de < 3 a 7×10^1 NMP.g⁻¹, sendo que a maior população foi encontrada na marca D, ralada industrialmente, e única positiva (1,6 %) no mencionado grupo. Nos queijos ralados no momento da venda, 10 amostras (16,6 %) continham alguma população da referida bactéria. Quando submetidas à análise estatística, denota-se diferenças significativas (teste de qui-quadrado, $p < 0,01$). Entretanto, apesar da bactéria ter sido encontrada em 9,1 % das amostras raladas industrialmente e no ato da venda, as populações estão em patamares microbiologicamente aceitáveis. Resultados próximos foram obtidos por Salvador et al (2001) que não encontraram amostras contendo tal bactéria. Entretanto, Abreu et al (2010b) encontraram *E. coli* em 33,3 % das amostras taladas industrialmente analisadas, sendo que duas dessas amostras continham populações elevadas ($3,5 \times 10^3$ e $6,2 \times 10^3$ NMP.g⁻¹).

Uma das possíveis justificativas para populações reduzidas de *E. coli* nas amostras analisadas é a baixa atividade de água (*aw*) dos queijos ralados tipo parmesão. Sabe-se que as enterobactérias, grupo que a *E. coli* pertence, necessitam de valores de atividade de água superiores aos presentes neste tipo de alimento (ABREU et al, 2010b).

Outro grupo bacteriano de ampla importância no aspecto da saúde pública são as salmonelas. Entretanto, tal bactéria não foi encontrada em nenhuma das amostras analisadas no presente estudo. Os resultados condizem com outros estudos semelhantes. Salvador et al (2001) e Trombete, Fraga e Saldanha (2012) também não encontraram microrganismos do gênero *Salmonella*. Em contra partida, 6,6 % das amostras de queijo parmesão raladas industrialmente analisadas por Nogueira, Mariotti e Bueno (2013) apresentaram resultados positivos para bactéria do especificado gênero.

6. CONCLUSÕES

Em vista do grande consumo de queijo parmesão ralado no Brasil, associada à preocupação com a qualidade do referido produto e possíveis riscos de contaminação por agentes veiculadores de doenças de origem alimentar, enfatiza-se a importância do presente estudo, assim como as conclusões que se seguem:

- Microrganismos heterotróficos mesófilos foram detectados em 100,0 % das amostras. Apesar de não haver limites na legislação brasileira para tais, quando comparados aos encontrados na literatura, todas as amostras raladas industrialmente estavam dentro do aceitável para o consumo humano enquanto 91,6 % das raladas no ato da venda estavam inapropriadas para ingestão;

- A presença de *Staphylococcus* spp. foi constatada em 100,0 % das amostras analisadas, das quais 16,6 % das amostras raladas industrialmente e 88,3 % das raladas no momento da venda apresentaram populações de *Staphylococcus* coagulase positivos além dos limites permitidos pela legislação;

- *Staphylococcus aureus* foi detectado em 30,0 % e 86,6 % das amostras raladas industrialmente e no momento da venda, respectivamente, sendo que 16,6 % no primeiro grupo e 86,6 % no segundo grupo estavam com populações acima dos referidos da literatura.

- Para coliformes totais, coliformes termotolerantes e *Escherichia coli*, foram encontradas, respectivamente, 22,5 %, 9,16 % e 9,16 % de amostras contaminadas. Entretanto, todas estavam dentro dos patamares aceitáveis.

- Bolores e leveduras foram encontrados em 82,5 % das amostras analisadas, das quais 21,6 % das raladas industrialmente e 90,0 % das raladas no ato da venda estavam acima dos parâmetros adotados na literatura, pelo fato de não haver legislação que limite a quantidade deste grupo de microrganismo no comércio;

- Em nenhuma das amostras analisadas foi isolada *Salmonella* spp.

- Quando comparados estatisticamente os dois métodos de ralagem do queijo parmesão (industrial ou no ato da venda), foram constatadas diferenças significativas. No geral, o queijo ralado industrialmente apresenta menor quantidade de contaminantes resultando em uma menor probabilidade de veiculação de microrganismos patogênicos e deteriorantes que os queijos ralados no ato da venda.

7. REFERÊNCIAS

- ABREU, E. S. A.; SIMONY, R. F.; DIAS, D. H. S.; RIBEIRO, F. R. O.; GONÇALVES, P. P. O.; PINESI, P. Eficácia dos métodos de higienização de utensílios em restaurantes comerciais. **Revista Simbio-Logias**, v.3, n.5, 2010a.
- ABREU, A. N. I.; BATISTA, L. R.; ABREU, L. R.; PINTO, S. M.; PEADO, G.; OLIVEIRA, M. S. Qualidade Microbiológica de Queijo Ralado Comercializado no Estado de Minas Gerais, **XIX Congresso de Pós-Graduação da UFLA**, 2010b.
- ADESIYUN, A. A.; TATINI, S. R.; HOOVER, D. G. Productions of enterotoxins by *Staphylococcus hyicus*. **Veterinary Microbiology**, Shannon, v.9, n.5, p.487-495, 1984.
- ANDRADE, N. J.; SILVA, R. M. M.; BRABES, K. C. S. Avaliação das condições microbiológicas em unidades de alimentação e nutrição. **Ciência e Agrotecnologia**., v..27, n.3, p.590-596, maio/jun. 2003.
- APHA, American Public Health Association. Committee on microbiological methods for foods. **Compendium of methods for the microbiological examination of foods**. 4 ed. Washington: APHA, 2001. 676p.
- ÁVILA, C. R.; GALLO, C. R. Pesquisa de Salmonella spp. em leite cru, leite pasteurizado tipo C e queijo “Minas Frescal” comercializados no município de Piracicaba - SP. **Scientia Agricola**. v.53, n. 1, p. 159- 163, jan/abr. 1996.
- BAUER, A. W.; KIRBY, W. M. M.; SHERRIS, J.C.; TURCK, M. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. **American Journal of Clinical Pathology**, v. 45, n. 4, p. 493-496, 1966.
- BECKER, K.; KELLER, B.; EIFF, C. V.; BRÜCK, M.; LUBRITZ, G.; ETIENNE, J.; PETERS, G. Enterotoxigenic potential of *Staphylococcus intermedius*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.67, n.12, p.5551-5557, 2001.
- BEMRAH, N.; SANNA, M.; CASSIN, M.H.; GRIFFITHS, M.W.; CERF, O. Quantitative risk assessment of human listeriosis from consumption of soft cheese made from raw milk. **Preventive Veterinary Medicine**, v.37, n.1/4, p.129-145, 1999.
- BERGDOLL, M. S.; BENNETT, R. W. Staphylococcal Enterotoxins. In: Compendium of Methods for the Microbiological Examination for Foods. Ch. 34. 2a. Ed. **American Public Health Association**; Washington, p. 428-457, 1989.
- BORGES, M. F., ARCURI, E. F.; PEREIRA, J. L.; FEITOSA, T.; KUAYE, A. Y. Staphylococcus enterotoxigênicos em leite e produtos lácteos, suas enterotoxinas e genes associados: revisão. **Boletim do Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos**, v. 26, n. 1, p. 70-86, 2008.

BOTTAZZI, V., BATTISTOTTI, B., CAPPA, F., REBECCHI, A., BERTUZZI, S., BRAMBILLA, E. Germinazione delle spore di *Clostridium* ed azione del lisozima in formaggio grana. **Scienza e Técnica Lattiero-casearia**, v. 44, n. 2, p. 79-96, 1993.

BRASIL, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Resolução – RDC nº 12, de 2 de janeiro de 2001**. Disponível em: http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/12_01rdc.html. Acesso em: 12 de abr. 2014.

BRASIL, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 62 de 26 de agosto de 2003. Oficializa os métodos analíticos oficiais para análises microbiológicas para controle de produtos de origem animal e água. **Diário Oficial da União**, Brasília, p. 14, Seção 1, 2003.

BRASIL, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Portaria Nº 357, de 04 de Setembro de 1997. Regulamento Técnico para Fixação de Identidade e Qualidade de Queijo Ralado. **Diário Oficial da União**, Brasília. Seção 1, 1997.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Portaria nº 146, de 07/03/96. Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Queijos. **Brasília: Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento**, 1996.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Doenças Transmitidas por Alimentos**. Disponível em: < <http://portalsaude.saude.gov.br/index.php/o-ministerio/principal/secretarias/svs/doencas-transmitidas-por-alimentos-dta> >. Acesso em: 20 mai. 2014.

BRENER, D.J. Facultatively anaerobic Gram-negative rods. In: **Bergey's manual of systematic bacteriology**. Cap.7, p.408-423, 1984.

BREWER, M. S. Food storage, food spoilage, and foodborn illness. **Urbana, Illinois: Phyllis Yates Picklesimer**, p. 19, 1991.

BULLERMAN, L.B. Incidence of mycotoxic molds in domestic and imported cheese. **Journal Food Safety**, v.2, p.47-58, 1980.

CAMACHO, N. N.; MARINI, P.; ARMAS, R. D.; RIBEIRO, G. A.; TESSMANN, C. Determinação de *Staphylococcus* coagulase positiva e de indicadores higiênico-sanitários em amostras de queijo ralado. **XIII Congresso de Iniciação Científica**, 2004

CARMO, L.S.; DIAS, R.S.; LINARDI, V.R. et al. Food poisoning due to enterotoxigenic strains of *Staphylococcus* present in Minas Cheese and raw milk in Brasil. **Food Microbiology**., v.19, p.9-14, 2002.

CARVALHO, E. P. **Microbiologia de alimentos**. Lavras: UFLA/FAEP, 1999. p.76

CDC. Center for Disease Control and Prevention. **EPI INFO™ 7.1.1.14**. StatCalc algorithms and formulas provided by OpenEpi.com. Disponível em: <<http://wwwn.cdc.gov/epiinfo/7/index.htm>>. Acesso em 24 junho 2014.

CDC. Center for Disease Control and Prevention. **Salmonella**. 2012. Disponível em: <<http://www.cdc.gov/salmonella>>. Acesso em: 24 abr. 2014.

CLSI. Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing: nineteen informational supplement (M100-S21), **Wayne, PA**: CLSI, 2011.

COMA, V. Bioactive packaging technologies for extended shelf life of meat-based products. **Meat Science**, v.78, n. 3, p. 90-103, fev., 2008.

CUNHA NETO, A.; SILVA, C. G. M.; STAMFORD, T. L. M. *Staphylococcus* enterotoxigênicos em alimentos in natura e processados no estado de Pernambuco, Brasil. **Ciência e Tecnologia dos Alimentos**, Campinas, v. 22, n. 3, p. 263-271, 2002.

DDTHA, Divisão de Doenças de Transmissão Hídrica e Alimentar. **Surtos de DTAs – Perguntas e Respostas e Dados Estatísticos**. Disponível em: ftp://ftp.cve.saude.sp.gov.br/doc_tec/hidrica/doc/surtodta_pergresp.pdf, p. 4-6. 2009.

DDTHA, Divisão de Doenças de Transmissão Hídrica e Alimentar. **Surtos de doenças transmitidas por água e alimentos (dta) notificados a ddtha/cve, 2012**. Disponível em: [ftp://ftp.cve.saude.sp.gov.br/doc_tec/hidrica/dados/Surto12_DTAESP final.xlsx](ftp://ftp.cve.saude.sp.gov.br/doc_tec/hidrica/dados/Surto12_DTAESP_final.xlsx), 2014.

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

DOYLE, M. P.; BEUCHAT, L. R. MONTVILLE, T. J. Food microbiology: fundamentals and frontiers. **American Society for Microbiology**. 2007.

EKDAHL, K.; JONG, B.; WOLLIN, R.; ANDERSSON, Y. Travel-associated non-typhoidal salmonellosis: geographical and seasonal differences and serotype distribution. **Clinical Microbiology and Infection**. vol 11: 138–144, 2005

FEITOSA, T.; BORGES, M. F.; NASSU, R. T.; AZEVEDO, E. H. F.; MUNIZ, C. R. Pesquisa de *Salmonella* sp., *Listeria* sp. e microrganismos indicadores higiênico-sanitários em queijos produzidos no estado do Rio Grande do Norte. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 23, 2003.

FORSYTHE, S. J. Microbiologia da segurança alimentar. Porto Alegre: **Artmed**, 2002. 424p.

FRANCIS, D.H. Enterotoxigenic *Escherichia coli* infection in pigs and its diagnosis. **J. Swine Health Prod.**, v.10, p.171- 175, 2002.

FRANCO, R. M.; ALMEIDA L.E.F. de. Avaliação microbiológica de queijo ralado, tipo parmesão comercializado em Niterói. **Higiene Alimentar**, v.6, n.21, p.33-36, 1992.

FRAZIER, W.C.; WESTHOFF, D.C. Microbiologia de los alimentos. 4.ed. **Zaragoza: Acribia**, p. 583-592, 1993.

FREITAS, L. H. Sistema especialista para diagnóstico de toxinfecções alimentares de origem bacteriana. 1995. 97 f. **Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos)** - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa.

FURTADO, M. M. Principais problemas dos queijos: causas e prevenção. 2 ed. rev. São Paulo: **Fonte Comunicações e Editora**, 2005. 200 p.

GERRIOR, S.; PUTNAM, J.; BENTE, L. Milk and milk products: Their importance in the American diet. Food Review - **The Diet Quality Balancing Act**, p.29-37, Mai-Ago. 1998.

GIRARDINI, L. K. **Antimicrobianos e preseça de genes associados à formação de biofilmes (icaA e icaD) em *Staphylococcus aureus* isolados de propriedades produtoras de leite bovino**. 2013. Tese. (Doutorado em Ciência Veterinárias. Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Disponível em: <<http://www.lume.ufrgs.br/bitstream/handle/10183/81208/000904461.pdf?sequence=1>>. Acesso em: 25 abr. 2014.

GOMES, M.J.P. **Gênero *Staphylococcus* spp.**. 2013. Disponível em: <<http://www.ufrgs.br/labacvet/files/G%C3%AAnero%20Staphylococcus%20spp%204-2013-1.pdf>>. Acesso em: 28 abr. 2014.

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

ICMSF. International Commission on Microbiological Standards for Foods. Microorganismos de los alimentos : métodos de muestro. In; CANDERZANT, C.; SPLITTSTOESSER, D. F. **Para análisis microbiológicos: principios y aplicaciones específicas**. Zaragoza: Acribia. Cap. 8, p. 91-103, 1981.

INPPAZ/OPS/OMS. Instituto Panamericano de Protección de los Alimentos y Zoonosis / Organización Panamericana de la Salud/Organización Mundial de la Salud. Vigilancia Epidemiológica. **Sistema de información regional para la vigilancia epidemiológica de las enfermedades transmitidas por alimentos [SIRVETA]**. 2006. Disponível em: <<http://www.panalimentos.org/sirveta/e/salida2.asp>>. Acesso em: 14 mai. 2014.

JAY, J.M. Microbiologia de alimentos. 6 ed. **Editora Artmed**, Porto Alegre. 711 p, 2005.

JAY, J. M. **Modern food microbiology**. 4. ed. New York: Chapman & Hall, 1992.

JORDANO, R.; LOPEZ, C.; RODRIGUEZ, V.; CORDOBA, G.; MEDINA, L. M.; BARRIOS, J. Comparison of Petrifilm method to conventional methods for enumerating aerobic bacteria, coliforms, *Escherichia coli* and yeasts and molds in foods. **Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica**. 42:255-259, 1995.

KENNY, K.; REISER, R. F.; BASTIDA-CORCUERA, F. D.; NORCROSS, N. L. Production of enterotoxins and toxic shock syndrome toxin by bovine mammary isolates of *Staphylococcus aureus*. **Journal of Clinical Microbiology**, v.31, p.796-707, 1993.

LANITA, S. C.; SILVA, S. B. Uso de ozônio em câmara industrial para controle de bolores e leveduras durante a maturação de queijo tipo parmesão. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 11, n. 3, p. 182-189, jul./set. 2008

MACFADDIN, J. F. **Biochemical tests for identification of medical bacteria**. Baltimore: The Williams e Wilkins, 1976. 312.

MATTAR, T. V.; ABREU, A. N. I.; ABREU, L. R.; BATISTA, L. R. Análise da qualidade microbiológica de queijo ralado. **XXIV Congresso de Iniciação Científica da UFLA**. set. 2011.

MATSUNAGA, T., KAMATA, S., KIKIICHI, N. Characteristics of *Staphylococcus aureus* isolated from peracute, acute and chronic bovine mastitis. **Journal of Medical Sciences**, v.55, p.297-300, 1993.

MELO, P.C. **Estudo fenotípico e genotípico da produção de biofilmes por estirpes de *Staphylococcus aureus* isoladas dos casos de mastite subclínica bovina**. 2008. 122 f. Dissertação (Mestre em Medicina Veterinária) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, São Paulo.

MENDES, C. G.; SILVA, J. B. A.; ABRANTES, M. R. Caracterização organoléptica, físico-química, e microbiológica do leite de cabra: uma revisão. **Acta Veterinaria Brasilica**, v.3, n.1, p.5-12, 2009.

MIRANDA, A. E. F. Avaliação da Qualidade Microbiológica dos Queijos produzidos no Brasil – Revisão. In: Congresso Nacional de Laticínios, 25., 2008, Juiz de Fora. **Anais do 25° Congresso Nacional de Laticínios**. Juiz de Fora: EPAMIG/Instituto de Laticínios Cândido Tostes, 2008. p. 1-9.

MONTEIRO, R. Z.; BRUNA, G. C. O aço inoxidável em cozinhas profissionais. **VII Seminário Brasileiro do Aço Inoxidável**. São Paulo, novembro de 2004. Disponível em: <http://www.nucleinox.org.br/new/downloads/inox04/alim_01.pdf>. Acesso em 15 abril 2014

MURRAY, P.R.; ROSENTHAL, K.S. **Microbiologia Médica**. 3. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 47-157, 2000.

NATARO, J.P.; KAPER, J.B. Diarrheagenic *Escherichia coli*. **Clinical Microbiological Reviews**, v.11, n.1, p.142-201, 1998.

NOGUEIRA, A. M. S.; MARIOTTI, S. F. R.; BUENO, S. M. Análise da Qualidade Microbiológica de Queijo Ralado Comercializado em São José do Rio Preto - SP. **Revista Científica Unilago**. 2013.

OLIVEIRA, L. M. A.; ANJOS, L. M. J.; SOUZA, P. R. R.; BRUMANO, L. P.; BESSA, M. E.; PINTO, M. A. O. Avaliação da qualidade de queijos ralados para proteção à saúde pública. **Revista do Instituto de Laticínios “Cândido Tostes”**, Jan/Fev, nº 384, 67: 41-47, 2012

OMOE, K.; HU, D.L.; TAKAHASHI-OMOE, H; NAKANE, A; SHINAGAWA, K.. Comprehensive analysis of classical and newly described staphylococcal superantigenic toxin genes in *Staphylococcus aureus* isolates. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v.246, n.2, p.191-198, 2005.

PEREIRA, M.L; GASTELOIS, M. C. A.; BASTOS, E. M. A. F.; CAIAFFA, W. T.; FALEIRO, E. S. C. Enumeração de coliformes fecais e presença de *Salmonella* sp. em queijos minas. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 51, n. 5, 1999.

PERRY, K. S. P. Queijos: aspectos químicos, bioquímicos e microbiológicos. **Química Nova**, São Paulo, v. 27, n. 2, p. 293-300, mar./abr, 2004. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/qn/v27n2/19276.pdf>>. Acesso em: 08 mar 2014

PIMENTEL, E.F.; DIAS, R.S.; RIBEIRO-CUNHA, M.; GLÓRIA, M.B.A. Evaluation of the labelling and physico-chemical and microbiological quality of grated cheese. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v.22, n.3, 2002

POPOFF, M.Y.; BOCKEMUHL, J.; GHEESLING, L.L., 2004. Supplement 2002 (no 46) to the Kauffmann-White scheme. **Research in Microbiology**. 155, 568–570.

RADDI, M. S. G.; LEITE, C. Q. F.; MENDONÇA, C. P.. *Staphylococcus aureus*: portadores entre manipuladores de alimentos. **Revista Saúde Pública**, São Paulo, v. 22, n. 1, p. 36-40, 1988.

ROCOURT, J.; BUCHRIESER, C. The genus *Listeria* and *Listeria monocytogenes*: phylogenetic position, taxonomy, and identification. In: RYSER, E.T.; MARTH, E.H. (Ed.). 3.ed. **Listeria, listeriosis and food safety**. Boca Raton: CRC Press, 2007. Chap. 1, p.1-20

ROSEC J. P.; GUIRAUD J. P.; DALET C.; RICHARD N. Enterotoxin production by staphylococci isolated from foods in France. **International Journal of Food Microbiology**, v.35, p.213-221, 1997.

RYSER, E.T.; MARTH, E.H. (Ed). *Listeria, listeriosis, and food safety*. New York: **Marcel Dekker**, 1991. 632p.

SALAVESSA, J.J.S.M. **Salsicharia tradicional da zona do Pinhal: caracterização e melhoramento da tecnologia de fabrico dos Maranhos**. 2009. 321f. Tese. (Doutorado em Ciência e Tecnologia Animal) – Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Técnica de Lisboa. Disponível em: <<http://hdl.handle.net/10400.5/2843>>. Acesso em: 25 abr. 2014.

SALVADOR, M.; CAMASSOLA, M.; MOSCHEN, E. S.; ZANROSSO, A. V. Avaliação da qualidade microbiológica de queijo prato e parmesão ralado. **Boletim do Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos**, Curitiba, v. 19, n. 1, p. 65-74, jan./jun. 2001.

SANTOS, S. S. **Investigação da presença e da formação de biofilmes por estafilococos em micro-usina de beneficiamento de leite**. Jaboticabal: 2009. p. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2009.

SCHREINER, M.C.P.; TEIXEIRA, A.D.C.R. A vigilância sanitária de alimentos e o desafio da inserção da produção artesanal mineira no comércio formal. **Divulgação em Saúde para Debate**, Rio de Janeiro, n. 25, p. 46-54, 2001.

SERIDAN, B. Qualidade Microbiológica de Queijos produzidos em Minas Gerais. In: Encontro Nacional de Analistas de Alimentos, 16, 2009, Belo Horizonte. **Anais**. São Paulo: Sociedade Brasileira de Analistas de Alimentos, 2009. 1 CD-ROM

SILVA, E. P.; BERGAMINI A. M. M.; OLIVEIRA M. A. *Staphylococcus aureus* como agente causal de surtos de enfermidades transmitidas por alimentos, ocorridos na região de Ribeirão Preto, SP, 2005 a 2008. In: Encontro Nacional de Analistas de Alimentos, 16, 2009, Belo Horizonte. **Anais**. São Paulo: Sociedade Brasileira de Analistas de Alimentos, 2009. 1 CD-ROM.

SILVA, L. F. Procedimento Operacional Padronizado de Higienização como Requisito para Segurança Alimentar em Unidade de Alimentação. 2006. 69 f. **Dissertação (Mestrado)** - Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2006.

SILVA, N.; JUNQUEIRA, V.C.A.; SILVEIRA N. F. A. Manual de métodos de análises microbiológicas de alimentos. **Editora Varela**, São Paulo, p.310, 1997.

SILVA, N.; JUNQUEIRA, V.C.A.; SILVEIRA, N. F. A. **Manual de métodos de análises microbiológicas de alimentos**. São Paulo: Livraria Varela, 2001. 317p

SILVA JUNIOR 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** 10(24):71-75, 2001.

STADHOUDERS, J., HUP, G., NIEUWENHOF, F. F. J. Silage and cheese quality. Nizo mededeling M 19 A. **Netherlands Institute for Dairy Research**, Ede, The Netherlands, 1983.

TANIWAKI, M. H.; SILVA, N. Fungos em alimentos: Ocorrência e detecção. Campinas: **Instituto de Tecnologia de Alimentos**, 2001. 82 p.

THEODORSSON-NORHEIM, E. Kruskal-Wallis test: BASIC computer program to perform nonparametric one-way analysis of variance and multiple comparisons on ranks of several independent samples. **Computer Methods and Programs in Biomedicine**. Volume 23, Issue 1, Pages 57–62, 1986.

THERON, M.; LUES, J. Organic acids and meat preservation: a review. **Food reviews international**, v. 23, n. 2, p. 141-158, abr. 2007.

TROMBETE, F. M.; FRAGA, M. E.; SALDANHA, T. Avaliação da qualidade química e microbiológica de queijo parmesão ralado comercializado no Rio de Janeiro. **Revista do Instituto de Laticínios “Cândido Tostes”**, Mar/Abr, nº 385, 67: 11-16, 2012

UNITED STATES. Department of Health and Human Services. **Quantitative assessment of the relative risk to public health from foodborne Listeria monocytogenes among selected categories of ready-to-eat foods**. 2003. Disponível em: <<http://www.foodsafety.gov/dms/lmr2-toc.html>>. Acesso em: 20 fev. 2014.

USDA. United States Department of Agriculture, **Dairy and Products Annual. Annual Dairy Report**. October, 2013. Disponível em <<http://gain.fas.usda.gov/Recent%20GAIN%20Publications/Dairy%20and%20Products%20Annual%20Brasilia%20Brazil%2010-16-2013.pdf>> p. 6. Acesso em 04 Mai, 2014.

VANZO, S.P.; AZEVEDO, R.V.P. Detecção de S. aureus em manipuladores de alimentos - perfil da resistência a antibióticos e quimioterápicos. **Higiene Alimentar**, v.17, n.104/105, p.114-123, 2003.

VARNAM, A. H.; EVANS, M. G. Foodborn pathogens: an illustrated text. **London: Mosby Year Book**, 547 p., 1991.

VIDAL-MARTINS, A. M. C.; ROSSI JUNIOR, O.D.; REZENDE-LAGO, N.C. Microrganismos heterotróficos mesófilos e bactérias do grupo do Bacillus cereus em leite integral submetido a ultra alta temperatura. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.57, n.3, p.396-400, 2005

ZAFALON, L. F.; LONGONI, H.; BENVENUTTO, F.; CASTELANI, L.; BROCCOLO, C. R.. Aspectos epidemiológicos da mastite bovina causada por *Staphylococcus aureus*. **Veterinária e Zootecnia**, Botucatu, v.15, n.1, p.56-65, 2008.

ZAFALON, L.F.; NADER FILHO, A.; OLIVEIRA, J.V.; RESENDE, F.D. Mastite subclínica causada por *Staphylococcus aureus*: custo-benefício da antibioticoterapia de vacas em lactação. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.59, n.3, p.577-585, 2007

ZECCONI, A.; HAHN, G. *Staphylococcus aureus* in raw milk and human health risk. **Bulletin of the International Dairy Federation**, v.345, p.15-18, 2000.

ZOLI, J. A.; NEGRETE, I. R. A.; OLIVEIRA, T. C. R. M. Avaliação da contaminação por *Staphylococcus aureus* e *Salmonella* spp. De maionese de batata comercializada em Londrina, PR. **Higiene Alimentar**, v. 16, n. 95m p. 62-70, 2002.