ARTIGO CIENTÍFICO

REVISTA DE MEDICINA VETERINÁRIA DO UNIFESO
v. 5, n. 1, (2025) | ISSN 2764-3263

ANÁLISE MICROBIOLÓGICA COMO FERRAMENTA PARA BOAS PRÁTICAS DE FABRICAÇÃO EM ENTREPOSTO DE LEITE DO ESTADO DO RIO DE JANEIRO

MICROBIOLOGICAL ANALYSIS AS A TOOL FOR GOOD MANUFACTURING PRACTICES IN MILK WAREHOUSES IN THE STATE OF RIO DE JANEIRO

Lara Cani Azevedo[1]; Flávia Aline Andrade Calixto[2]; Maria Eduarda Monteiro da Silva[2]; Laura Ribeiro Cerqueira de Oliveira[3]; Thamara Dias Fernandes[2]

RESUMO

O leite é rico em nutrientes possibilita a produção de diversos derivados, viabilizando a fabricação de grande quantidade de produtos lácteos, como os queijos. O queijo Minas Frescal, possui alta umidade, e é feito para ser consumido fresco. Possui características nutritivas e teor de umidade que o torna mais perecível e suscetível a contaminações por microrganismos. Essas bactérias, além de interferir na qualidade final do produto, podem ocasionar algumas das Doenças Veiculadas por Alimentos (DVAs), causando diversos riscos à saúde. Esta pesquisa teve por objetivo analisar a qualidade microbiológica de queijo Minas Frescal produzido em entreposto de leite e derivados do estado do Rio de Janeiro, assim como, da higienização de equipamentos e utensílio com a intenção de avaliar se a higiene das instalações interfere no produto final. Foram utilizados métodos de plaqueamento em superfície, método de análise número mais provável – NMP e testes bioquímicos utilizando ágar Citrato de Simmons; Caldo Vermelho de Metila-Voges Proskauer (VM-VP) e meio Motilidade Indol e H2S (SIM). Nos resultados obtidos as amostras QA2 e ST2 tiveram contagens distintas de coliformes e *E. coli*, sendo QA2 superior aos limites estabelecidos na legislação vigente. Nas análises bioquímicas, Q1 e Q3 foram sugestivas para *E. coli*, com Q3 apresentando resultados sugestivos nos testes de citrato, vermelho de metila e indol. Apresentaram ausência de *Salmonella spp.* em todas as amostras e altas contagens de *Staphylococcus spp.*. Contagens >100 NMP/g e 6x10² UFC/mL de bactérias mesófilas no *swab* do tanque e da forma, respectivamente.

Palavras-chave: Contagem de coliformes. Higiene Industrial. Produtos lácteos.

ABSTRACT

Milk is rich in nutrients, enabling the production of various derivatives and the manufacture of large quantities of dairy products, such as cheese. Minas Frescal cheese has high moisture content and is made to be consumed fresh. It has nutritional characteristics and a moisture content that make it more perishable and susceptible to contamination by microorganisms. These bacteria, in addition to affecting the final quality of the product, can cause some Foodborne Illnesses (FBIs), posing various health risks. This research aimed to analyze the microbiological quality of Minas Frescal cheese produced in a milk processing facility in the state of Rio de Janeiro, as well as the hygiene of equipment and utensils, with the goal of assessing whether facility hygiene affects the final product. Surface plating methods, the Most Probable Number (MPN) analysis method, and biochemical tests using Simmons Citrate Agar; Methyl Red-Voges Proskauer (MR-VP) Broth; and Motility Indole and H2S (SIM) medium were used. In the results obtained, samples QA2 and ST2 had different counts of coliforms and *E. coli*, with QA2 exceeding the limits established in current legislation. In biochemical analyses, Q1 and Q3 were suggestive for *E. coli*, with Q3 showing suggestive results in the citrate, methyl red, and indole tests. All samples were free from *Salmonella* spp., but high counts of *Staphylococcus* spp. were detected, with counts >100 MPN/g and 6x10² CFU/mL of mesophilic bacteria in the tank and mold swabs, respectively.

Keywords: Coliform count. Industrial Hygiene. Dairy products.

1 Discente em Medicina Veterinária do UNIFESO – eularacani@gmail.com

2 Docente do curso de Medicina Veterinária do UNIFESO – flavialinecalixto@unifeso.edu.br; mariaeduardasilva@unifeso.edu.br; thamarafernandes@unifeso.edu.br

3 Doutoranda UFF – laurarco@id.uff.br

REVISTA DE MEDICINA VETERINÁRIA DO UNIFESO
v. 5, n. 1, (2025) | ISSN 2764-3263

INTRODUÇÃO

A história da indústria leiteira no país remonta a 1532, com o desembarque dos primeiros bovinos. Desde então, houve um desenvolvimento gradativo, com marcos importantes, como a regulamentação da pasteurização em 1952 e a criação da Embrapa Gado de Leite em 1973. Nos últimos 50 anos, o setor cresceu significativamente em termos de produtividade e competitividade, tornando o Brasil o terceiro maior produtor mundial de leite, desempenhando um papel fundamental na economia agropecuária (1). O leite é um dos alimentos mais completos e versáteis na alimentação humana, sendo uma importante fonte de nutrientes essenciais como proteínas, gorduras, carboidratos, vitaminas e minerais. Do ponto de vista nutricional, o leite contém proteínas de alto valor biológico, como a caseína e a lactoalbumina (2). Além disso, o leite é uma fonte significativa de cálcio e fósforo, minerais essenciais para a saúde, assim como as vitaminas A, D, E e K. A lactose, principal carboidrato presente no leite, também tem papel importante no fornecimento de energia e no estímulo da absorção de cálcio no intestino (3). Contudo, o leite é um alimento altamente perecível e propenso à contaminação por microrganismos, o que pode comprometer sua qualidade e segurança. Por essa razão, a legislação brasileira impõe rigorosos controles de qualidade e higiene na produção, manuseio e transporte do leite e seus derivados, como forma de garantir a segurança dos alimentos e proteger a saúde dos consumidores (4,5).

A pasteurização é um dos processos mais importantes no controle da qualidade microbiológica do leite, eliminando microrganismos patogênicos, como *Salmonella* e *Escherichia coli*, e reduzindo o risco de doenças veiculadas pelos alimentos (DVAs). Apesar disso, a contaminação ainda pode ocorrer em outras etapas, como durante o armazenamento ou a manipulação inadequada dos produtos lácteos (6,7). Além de ser consumido diretamente, o leite é amplamente utilizado na produção de diversos derivados, como queijos, iogurtes, manteigas e leites fermentados, agregando valor à cadeia produtiva e atendendo às necessidades de diferentes mercados consumidores.

No Brasil, o queijo minas frescal, que é produzido a partir de leite pasteurizado, destaca-se entre os derivados devido características únicas. Com alto teor de umidade e feito para ser consumido fresco, o queijo minas frescal é mais suscetível à contaminação por microrganismos. Esses fatores causam preocupação em relação à segurança alimentar e reforçam a necessidade de boas práticas de fabricação em todas as fases da produção do leite, desde a ordenha até o processamento final, a fim de garantir a qualidade dos produtos oferecidos ao mercado (8). A contaminação dos alimentos ocorre através dos agentes químicos, físicos ou biológicos que se incorporam ao alimento de forma não intencional e podem causar danos à saúde da população (9). Os agentes biológicos são microrganismos patogênicos que, ao entrarem em contato com os alimentos podem ou não liberar toxinas, causando infecções, intoxicações ou toxinfecções, a depender do tipo de bactéria ingerida e levar as Doenças Veiculadas por Alimentos (DVAs) (10), que são de extrema importância para saúde pública visto que algumas contaminações por microrganismos como *Salmonella*, *Staphyloccoccus*, *Escheria Coli* e outros, podem levar a infecções generalizadas, hospitalização e até mesmo a óbito, principalmente em se tratando de crianças, idosos, grávidas e pessoas imunodeprimidas (11). Um estudo mostrou que 7,5% dos queijos industrializados e 15% dos queijos artesanais apresentaram contagens de coliformes termotolerantes acima do limite permitido, o que torna esses produtos impróprios para o consumo. A presença de *E. coli* em queijos, especialmente os produzidos de forma artesanal, indica não apenas falhas nos procedimentos de higiene, mas também a possibilidade de contaminação durante o processamento ou após a produção (12). Por isso se faz necessária a obrigatoriedade da inspeção sanitária de produtos de origem animal, que teve início no Brasil a partir da Lei nº 1.283, de 18 de dezembro de1950, conhecida como lei mãe da inspeção, que define sobre o âmbito de atuação, competências na fiscalização, abrangências, saúde pública entre outros aspectos (13). Ao longo dos anos, as leis foram sendo aperfeiçoadas através de outras normas, resoluções, decretos e portarias, como por exemplo, o Regulamento Técnico sobre as Condições Higiênico-Sanitárias e de Boas Práticas de Fabricação (14).

REVISTA DE MEDICINA VETERINÁRIA DO UNIFESO
v. 5, n. 1, (2025) | ISSN 2764-3263

As Boas práticas de Fabricação Consistem em um conjunto de procedimentos que devem ser implementados em serviços de alimentação para assegurar a qualidade higiênico-sanitária dos alimentos e garantir que estes estejam em conformidade com a legislação sanitária vigente. Esse enfoque visa proteger a saúde pública e promover a segurança alimentar, estabelecendo normas e diretrizes que orientam desde a manipulação até o armazenamento dos produtos alimentícios (15).

OBJETIVO

Diante desse contexto, o presente estudo teve como objetivo analisar a qualidade microbiológica do queijo minas frescal produzido em um entreposto de leite e derivados do estado do Rio de Janeiro, assim como avaliar as práticas de higienização de equipamentos e utensílios para verificar as condições sanitárias das instalações e a qualidade do produto final.

METODOLOGIA

Foram realizadas análises microbiológicas de queijo minas frescal e *swab* de utensílios e equipamentos de entreposto do Estado do Rio de Janeiro no Laboratório de Microbiologia do *Campus* Quinta do Paraíso do Centro Universitário Serra dos órgãos – UNIFESO, no período de março a maio de 2024. As análises foram realizadas de acordo com o disposto na IN 161, da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), que determina o padrão microbiológico para alimentos, incluindo o queijo Minas Frescal: pesquisa de *Salmonella* spp., contagem de *Staphylococcus* coagulase positiva *e* contagem por número mais provável (NMP) de coliformes totais, termotolerantes com confirmação de *E. coli.* Para análise de condições higiênico-sanitárias de utensílios e equipamentos do entreposto foram realizadas contagem de mesófilos e contagem por NMP de coliformes totais e coliformes termotolerantes e confirmação para *E. coli.*

As amostras foram coletadas em entreposto de leite do Estado do Rio de Janeiro. Os queijos da primeira etapa foram identificados como Q1, Q2, Q3, Q4 e o da segunda etapa de análise como QA2. Os *swabs* foram identificados como ST, "*swab* tanque" e SF "*swab* forma". Posteriormente foi repetido o *swab* do tanque após recomendação de higienização, esse *swab* da segunda análise como ST2. As amostras foram transportas do entreposto ao laboratório em caixa térmica com barras de Gelo Gel Artificial Reutilizável de 200ml 12x7x2,9 cm Gelotech. Para coleta da amostra com *swab* foi utilizado um molde de 5 x10 cm (50cm^2) previamente esterilizado em autoclave (Figura 1). Realizaram-se diluições seriadas em nível 10^{-1}, 10^{-2}, 10^{-3} e 10^{-4}, para as amostras de queijo Minas Frescal. Foram utilizadas oito vidrarias Erlenmeyer com 225 mL de Água Peptonada para diluição de 25g de amostra, sendo quatro para diluição das amostras de queijo e quatro para a etapa de pré-enriquecimento da análise de *Salmonella spp.* Primeiro foram pesadas as 25g de amostra, utilizando balança eletrônica de precisão da marca SHIMADZU e modelo BL3200H, depois foi adicionada um pouco de água peptonada no graal para ajudar a macerar a amostra e transferir para o Erlenmeyer com o restante da Água Peptonada e foi homogeneizada a mistura (Figura 2). Esse mesmo processo foi realizado com as quatro amostras na zona de segurança do bico de Bunsen. O mesmo processo foi realizado em todas as diluições 10^{-1}. Foram feitas diluições sucessivas a partir da diluição 10^{-1}, sempre transferindo 1 mL da diluição anterior, até obtenção da diluição 10-^{4}. Após as diluições, os tubos foram acondicionados em estufa bacteriológica á 37ºC por 24 horas. Os *swabs*, colocados em meio neutro próprio do *swab*, e depois transferidos cada um para um tubo de ensaio com 9 mL de Água Peptonada, sendo este primeiro tubo a diluição 10^{-1}, e seguindo a mesmo processo citado anteriormente para as demais diluições. As diluições dos queijos e dos *swabs* foram identificadas de 10^{-1} a 10^{-4}. Para análise de *Staphylococcus aureus* foi utilizado o método de plaqueamento APHA

REVISTA DE MEDICINA VETERINÁRIA DO UNIFESO
v. 5, n. 1, (2025) | ISSN 2764-3263

39.63:2015 (16). Para análise de *Staphylococcus aureus*, foram utilizadas as diluições 10^{-1}, 10^{-2}, 10^{-3} e 10^{-4} supracitadas para plaqueamento em superfície. Inoculou-se 0,1 mL de cada diluição em Placas de Petri com meio Ágar Baird-Parker (BP) enriquecido com emulsão de ovo e Telurito de sódio (Figura 3), em duplicata, utilizando a micropipeta automática volume 100µL e sua respectiva ponteira, e a alça de vidro em L para espalhar o inóculo pela superfície. As placas foram incubadas invertidas na estufa bacteriológica a 37º C por 48h, até o crescimento das colônias.

Ao analisar as colônias, deve-se observar se são características para *Staphylococcus aureus*, apresentando cor preta ou cinza brilhantes, rodeadas por um halo claro transparente. As sugestivas foram transferidas para tubo contendo caldo Brain Heart Infusion, e acondicionado em estufa bacteriológica a 37º C por 24h. Após o período de incubação foram realizados testes de catalase e coagulase e coloração de Gram.

Para o teste de catalase positiva utilizou-se lâmina para esfregaço, água destilada estéril para a fixação da colônia e água oxigenada. Deve-se passar um pouco da água destilada na lâmina, depois, com a alça de inoculação, retira-se uma parte da mesma colônia que foi retirada para o BHI e transfere-a para a lâmina, espalhando. Em seguida, colocou-se um pouco água oxigenada esperando fervura para o resultado positivo (Figura 4). Para a coagulase, são utilizados tubos de ensaio de 10 mL com 0,5 mL de plasma de coelho e 0,2 do BHI que foi inoculado. Com ajuda da micropipeta automática, colocamos as quantidades adequadas nos tubos identificados e levamos ao banho maria a 35º C. Verificamos a cada 2 horas, por no mínimo 6h. Caso haja coagulação, é positivo (16).

A coloração de Gram tem com o objetivo de identificar as características morfotinturais, se as bactérias são Gram positivas ou negativas em formato de cocos ou bacilos. É realizada utilizando lâmina para esfregaço, corante cristal violeta, lugol, álcool etílico e fucsina. Deve-se colocar uma alçada com a alça de inoculação sobre a lâmina, passar rapidamente no bico de Bunsen para secar e começar a corar. Primeiro cobre a lâmina com corante cristal violeta e deixa por 60 segundos, lavar com água corrente; cobrir com lugol por mais 60 segundos e lavar novamente; aplicar o álcool por 30 segundos, lavar e esperar secar para observar no microscópio. Os *Staphylococcus* são cocos Gram positivos que se organizam em estruturas semelhantes a cachos de uva. Para obtenção de resultados presuntivos para coliformes totais e termotolerantes, utilizou-se o método de análise número mais provável – NMP ISO 7251:2005 (16), que permite estimar o número mais provável de microrganismo alvo presentes em uma amostra. Nesse método não é possível obter contagem fixa de células ou colônias, mas perceber a densidade de microrganismos viáveis presentes, sendo um teste qualitativo. Para análise de coliformes foram utilizadas as diluições já descritas até o 10^{-3} caracterizando contagem de NMP em série de três tubos. Para o início do teste presuntivo, é inoculado 1 mL das diluições das amostras (Q1, Q2, Q3, Q4, ST, SF) em triplicada, obtendo a série de três tubos com Caldo Lauril Sulfato Triptose (CLST) previamente identificados. Os tubos inoculados foram levados à estufa bacteriológica a 37ºC por 24h. Após esse tempo observa-se se há crescimento do microrganismo, através da turvação e produção de gás. Feita a inoculação nos tubos de CLST, os tubos que apresentaram resultado positivo, são utilizados para inoculação nos caldos EC para teste confirmativo de coliforme termotolerante/*E. coli* e VBBL para o de coliformes totais, através uma alçada com alça de inoculação, transferindo uma pequena alíquota para esses tubos, que em seguida devem ser levados ao banho maria a 44º C e a estufa por 24h, respectivamente, e conferir se há crescimento com produção de gás e turvação do tubo, obtendo assim, a confirmação da presença desse microrganismos. Para a analise de coliformes na amostra do *swab* foi realizado o mesmo processo. Ao final, é feita a contagem de quantos tubos foram positivos para cada diluição e então é determinado o Número mais provável para coliformes totais e coliformes termotolerantes de acordo com a tabela NMP. Após os resultados positivos para os caldos EC após as 24h, foi passada uma alçada de cada tubo para um meio MacConkey por técnica de esgotamento por estriamento e levado à estufa por 48h, a fim de analisar se haveria crescimento de colônias características de *E. coli,* que nesse meio de cultura são rosadas para bactérias fermentadores de lactose. As colônias sugestivas para

REVISTA DE MEDICINA VETERINÁRIA DO UNIFESO
v. 5, n. 1, (2025) | ISSN 2764-3263

E. coli foram enviadas ao Laboratório de Controle Microbiológico de Produtos de Origem Animal – LCM-POA - Faculdade de Veterinária da Universidade Federal Fluminense, para a realização do teste bioquímico e confirmação de *E. coli*. As Unidades Formadoras de Colônia (UFC) típicas foram reativadas em caldo BHI e semeadas em ágar Eosine Methilene Blue (EMB), e posteriormente incubadas a 35ºC por 24 horas. As UFC típicas de *E.coli* em EMB, com coloração verde metálico brilhante foram então inoculadas em meios para obtenção de confirmação bioquímica: ágar Citrato de Simmons; Caldo Vermelho de Metila-Voges Proskauer (VM-VP) e meio Motilidade Indol e H2S (SIM). Em ágar citrato de Simmons utilizou-se alça bacteriológica para estriamento da UFC na superfície do meio, com o resultado sugestivo de *E.coli* após a incubação, aquele em que não houve alcalinização do meio, e a coloração permaneceu verde. Para o teste do Indol, adiciona-se o reativo de Kovacs em meio inoculado e observou-se a formação de halo avermelhado sobre o meio; Para a prova de Vermelho de Metila, adicionou-se 5 gotas do reagente vermelho de metila em meio VM-VP inoculado, e observa-se a turvação do meio para vermelho, indicando um resultado positivo. Para confirmação de *E. coli,* as provas bioquímicas devem apresentar os seguintes resultados: citrato (-), VM (+), VP (-), Indol (+) e bastonetes Gram negativos. Para análise de mesófilos aeróbios mesófilos – CBHAM, foi utilizado o método de plaqueamento em superfície APHA 08:2015 para contagem total de aeróbios mesófilos em alimentos (16). O meio de cultura utilizado foi o Ágar Padrão para Contagem (APC), para contagem de mesófilos nas amostras dos *swabs* e queijos. Foram utilizadas as diluições 10^{-1} a 10^{-4}, em duplicata, onde alíquotas de 0,1 mL foram transferidas para suas respectivas placas, em duplicata, previamente identificadas com cada diluição. A inoculação foi realizada com auxilio da micropipeta, transferindo uma alíquota da amostra diluída para a superfície de uma placa de Petri contendo meio de cultura sólido APC. Depois de realizada a inoculação e alíquota estar seca, as placas foram invertidas e levadas à estufa a 35ºC por 24h (Figura 5). Com auxilio de um contador de colônias, são selecionadas as placas com 25 a 250 colônias, a fim de realizar contagem de unidades formadoras de colônias - UFC por amostra. Quando realizada análise em duplicata, deve-se fazer uma média aritmética entre as placas e na apresentação dos resultados, usar notação exponencial e apenas uma casa depois da vírgula. Para análise de Salmonela, foi utilizado o Método MLG/FSIS/USDA:2017 para presença/ausência de *Salmonella* em 25g de amostra (16). Foram utilizados quatro Erlenmeyer com 225 mL de Água Peptonada junto aos 25 g de amostra, que levados à estufa a 35ºC por 24h, cumprem a primeira etapa, do Pré-enriquecimento. A segunda etapa, do Enriquecimento Seletivo, é transferida uma alíquota de 0,1 mL das diluições enriquecidas para o Caldo Rappaport Vassiliadis (RVS) e 1 mL Caldo Tetrationato (TT) (Figura 6), que são levados a imersão em banho maria a 42º C e à estufa bacteriológica a 37º C, respectivamete, por mais 24h. Após as 24h, a terceira etapa, do plaqueamento seletivo, consiste em estriar os meios de cultura Ágar Salmonella Shigella (SS) e Ágar Xilose Lisina Desoxicolato (XLD), com uma alçada dos meios RVS e outra do TT, com auxilio da alça de inoculação. As placas devem ser levadas a estufa bacteriológica por 24h a 35ºC. Para o meio de cultura SS, quando o resultado após a incubação das placas é sugestivo, o meio de cultura muda de cor, se tornando amarelo e com as colônias pretas. O meio XLD, se mantém vermelho e possui colonias pretas bem distribuidas. Para confirmação das colônias típicas, com auxílio de uma agulha de inoculação, uma colônia é transferida para um tubo com Ágar Tríplice Açúcar Ferro (TSI), com o mesmo inóculo e sem flambar a agulha, inocular a cultura em tubo com Ágar Lisina Ferro (LIA), que serão incubados a 35º C por 24h. Ao fim, é feita uma junção de todos os resultados e detectada ausência ou presença de *Salmonella*.

REVISTA DE MEDICINA VETERINÁRIA DO UNIFESO
v. 5, n. 1, (2025) | ISSN 2764-3263

Figura 1 – Coleta da amostra do tanque utilizando *swab* para transporte e molde 5 x 10 cm

Figura 2 - A: pesagem da amostra para diluição; B: fragmentação da amostra a ser transferida para o Erlenmeyer na zona de segurança

Figura 3 – A: Emulsão de ovo e Terlurito de sódio; B: Placas com Ágar Baird-Parker

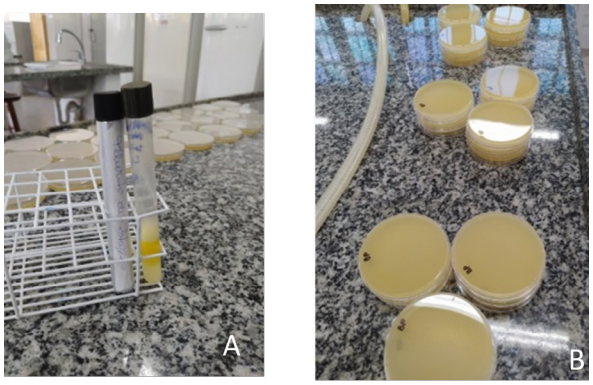

Figura 4 – Lâmina com fervura demonstrando teste positivo de catalase

Figura 5 - Placas de APC com amostra de swab do tanque para contagem de bactérias mesófilas

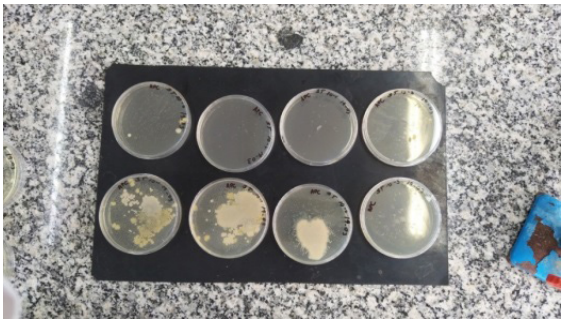

Figura 6 – Erlenmeyer enriquecidos e tubos de Duhan com Caldo RVS e TT, já com alíquota e prontos para enriquecimento seletivo

REVISTA DE MEDICINA VETERINÁRIA DO UNIFESO
v. 5, n. 1, (2025) | ISSN 2764-3263

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A tabela 1 apresenta os resultados microbiológicos das amostras analisadas, considerando os parâmetros de coliformes totais, coliformes termotolerantes e a presença de *E. coli*, comparando-os com os limites estabelecidos pela IN 161 da ANVISA (17) para queijo minas, alta umidade. As amostras Q1, Q2, Q3 e Q4, apresentaram valores elevados de coliformes totais e apenas o Q2 não apresentou valores elevados de coliformes termotolerantes. A única amostra que em bioquímica deu sugestiva de *E. coli* foi a Q1, as demais foram negativas em plaqueamento seletivo ou na prova de citrato, sendo essa amostra acima dos limites aceitáveis da legislação para esses microrganismos. Nas amostras de "swab" tanque e "swab" forma, utilizadas para verificar a higienização de superfícies, os resultados foram mais positivos. O "swab" do tanque mostrou contagens de 460 MPN/g para coliformes totais e 240 NMP/g para coliformes termotolerantes, valores que, embora inferiores às amostras de alimentos, ainda indicam presença de contaminação e sugerem a necessidade de melhorar a limpeza dos equipamentos. O "swab" da forma, por outro lado, apresentou contagens inferiores a 3 NMP/g para ambos os tipos de coliformes, o que demonstra uma boa condição de higiene nessa área específica. Os resultados indicam a necessidade de melhorias no controle higiênico-sanitário, principalmente nas amostras de alimentos.

Os resultados apresentados na tabela 2 indicam a análise microbiológica de amostras de produtos e "swabs", com o objetivo de verificar a presença de *Salmonella* e contagens de *Staphylococcus* nos queijos e contagem de bactérias mesófilas nos swabs de tanque e forma. Para as amostras Q1 a Q4, observa-se que houve ausência de *Salmonella* nas quatro amostras analisadas, o que é um resultado positivo do ponto de vista da segurança alimentar, visto que a presença de *Salmonella* em alimentos representa um risco significativo à saúde pública. Quanto à contagem de *Staphylococcus*, os resultados variam entre as amostras, com valores de $2x10^7$ UFC/g na amostra Q1, $2,4x10^7$ UFC/g em Q2, $9,1x10^6$ UFC/g em Q3 e $1,2x10^7$ UFC/g em Q4. Embora esses valores indiquem contaminação por *Staphylococcus* nas amostras, as colônias não se mostraram típica de coagulase positiva nas placas e esse resultado foi confirmado em teste de coagulase. Isso indica, que apesar de dentro do padrão microbiológico para esse microrganismo, medidas como capacitação de funcionários sobre boas práticas de fabricação ajudariam a reduzir esse número significativo de deteriorantes. Para as análises de contagem de bactérias mesófilas, que representam microrganismos que se desenvolvem em temperaturas médias, nas análises de *swab* de tanque, observou-se houve crescimento muito grande em placa que resultou em contagens superiores ao indicado para a técnica (>100 UFC/g), e no *swab* de forma foram encontradas $6x10^2$ UFC/g. Esses dados sugerem contaminação ambiental nas superfícies dos tanques e formas, indicando a necessidade de revisão das práticas de higienização.

No geral, a análise revela que, embora não tenha sido detectada *Salmonella*nas amostras, a presença de outros microrganismos patogênicos, assim como a contaminação mesofílica nas superfícies analisadas, aponta para possíveis falhas no controle microbiológico e práticas de higiene que devem ser corrigidas para garantir a segurança dos produtos. Apolinário, Santos e Lavorato (18) avaliaram a qualidade microbiológica de queijos minas frescal produzidos em laticínios de Minas Gerais, abordando a contaminação por *Escherichia coli*, *Salmonella* e outros microrganismos. Em sua pesquisa, os autores também identificaram alta contagem de coliformes totais e *E. coli* em algumas amostras, o que está em conformidade com os resultados apresentados na Tabela 1, onde amostras Q1, Q3 e Q4 apresentaram contagens de coliformes totais superiores a 1.100 NMP/g e também elevada presença de *E. coli*, em Q1. Além disso, o estudo de Apolinário *et al*. destacou a ausência de *Salmonella*, algo semelhante aos resultados obtidos na Tabela 2, que também mostrou ausência de *Salmonella* em todas as amostras analisadas (Q1 a Q4).Identificou ainda variações entre diferentes amostras de queijos em relação à contaminação por *Staphylococcus aureus*, assim como nos resultados da Tabela 2, onde houve elevadas contagens de *Staphylococcus* (especialmente na amostra Q3 e **Q4).** No estudo de **Coelho *et al*. (18),** que analisou queijos minas frescal de diferentes origens no sul do Espírito Santo, também houve preocupação

REVISTA DE MEDICINA VETERINÁRIA DO UNIFESO
v. 5, n. 1, (2025) | ISSN 2764-3263

com a contaminação por coliformes totais, *E. coli*, *Staphylococcus* e outros microrganismos. O estudo mostrou resultados preocupantes de coliformes e *E. coli*, particularmente em amostras provenientes de pequenos laticínios. Sendo um cenário mais alarmante que o presente trabalho. No estudo de Coelho, as amostras também foram testadas para *Staphylococcus*, sendo encontradas altas contagens, o que é corroborado pela **Tabela 2** do seu estudo, que mostrou valores elevados em todas as amostras, com destaque para **Q1** e **Q4**. Assim, ambas as pesquisas refletem problemas consistentes com a higiene no processo de produção, impactando na qualidade final dos produtos. Tanto os dados obtidos nas análises realizadas neste trabalho, quanto os achados de Apolinário, Santos e Lavorato (18) e Coelho et al. (19) revelam desafios semelhantes em relação à qualidade microbiológica de queijos minas frescal e indicam falhas no controle de higiene, que podem comprometer a segurança alimentar, sendo necessárias melhorias nas práticas sanitárias para reduzir os riscos à saúde pública. Tendo em vista esses resultados que indicam falhas nas boas práticas de fabricação, foi realizada uma capacitação interna com os funcionários e reanalisados amostra de queijo e *swab* de tanque quando ao teor de coliformes totais e termotolerantes. Os resultados se encontram na tabela 3. Na amostra QA2, os resultados na tabela 4 indicam uma contaminação elevada por coliformes totais, com todos os 9 tubos positivos nas repetições realizadas, resultando em um valor superior a 1100 NPM/g. Além disso, para a amostra QA2, os resultados para coliformes termotolerantes foram de 23 NMP/g, com 2 tubos positivos nas diluições de 10^{-1}, em um total de 9 tubos. Apesar de coliformes totais terem ainda apresentando contagens altas o número de coliformes termotolerantes reduziu significativamente, indicando que treinamento em higiene é eficaz e deve ser continuado. Por outro lado, a amostra ST2 apresentou resultados completamente negativos tanto para coliformes totais quanto para termotolerantes, onde nenhum tubo foi apresentou positividade (<3NMPNMP/g) em ambos os testes. Isso indica que a amostra está livre de contaminação microbiológica por esses indicadores, sugerindo que as práticas de higiene e controle sanitário adotadas durante o processo de produção, na limpeza dos tanques após aplicação das ações corretivas foram eficazes.

Tabela 1: Resultado das análises pra coliformes totais e termotolerantes

	Análises (NMP/g)			
Amostras/	**Coliformes totais**	**Coliformes termotolerantes**	***E.coli***	***E coli* IN 161 (Anvisa, 2022) ***
Q1	>1100	>1100	+	
Q2	>1100	36	-	m:10^2, M:10^3
Q3	>1100	>1100	-	
Q4	1100	>1100	-	
Swab tanque	460	240	-	
Swab forma	<3	<3	-	

Tabela 2: Resultados para análise de *Salmonella*, *Staphylococcus* e bactérias mesófilas

Amostras/Análises	***Salmonella***	***Staphylococcus***	**Mesófilas**
Q1	Ausência/25g	$2x10^7$	X
Q2	Ausência/25g	$2,4x10^7$	X
Q3	Ausência/25g	$9,1x10^6$	X
Q4	Ausência/25g	$1,2x10^7$	X
Swab tanque	x	x	>100
Swab forma	x	x	$6x10^2$

REVISTA DE MEDICINA VETERINÁRIA DO UNIFESO
v. 5, n. 1, (2025) | ISSN 2764-3263

Tabela 3: Resultados da segunda etapa de análises para pesquisa de Coliformes totais e termotolerantes

Amostras	Coliformes totais	Coliformes termotoleran-tes
QA2	>1100	23
ST2	0	0

CONCLUSÃO

Por mais que as primeiras análises não tenham demonstrado contaminação expressiva de microrganismos patogênicos, existe grande falha de contaminação higiênico-sanitária, que demanda uma intervenção nas boas praticas de fabricação. Após a capacitação foi realizada uma nova análise apresentando melhora em seus resultados e eficácia do treinamento. No entanto, é necessário que esse controle seja continuamente feito pelo estabelecimento.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Após notória diferença nos resultados e conversa com os proprietários do entreposto, ficou entendido que há boa vontade da parte de muitos produtores e donos de fábricas, no entanto falta auxilio nas demandas e mão de obra disponível qualificada. Sendo assim, seria interessante desenvolver projetos de extensão com os alunos interessados nessa área, a fim de colaborar com os pequenos produtores através de visitas, treinamentos e instruções, análises obedecendo aos preceitos legais, a fim de estimular e proporcionar melhorias nos estabelecimentos.

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao Centro Universitário Serra dos Órgãos - UNIFESO e todos os colaboradores que ajudaram no desenvolvimento desse trabalho, assim como aos proprietários do entreposto por ceder às amostras.

REFERENCIAS

1. Vilela D. A história dos 491 anos do leite no Brasil: passado, presente e o futuro? História do leite no Brasil: passado, presente e futuro. 2023.

2. Embrapa. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. Agronegócio do Leite. Dez 2021.

3. Peixoto MG, Carvalho MRS, Magalhães VMA. O leite bovino que produzimos e consumimos. Brasília, DF: Embrapa; 2022. 28 p.

4. Brasil. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa Nº 76, de 26 de novembro de 2018a. Regulamentos Técnicos que fixam a identidade e as características de qualidade que devem apresentar o leite cru refrigerado, o leite pasteurizado e o leite pasteurizado tipo A. Diário Oficial da União. 30 nov. 2018; Seção 1:9.

5. Brasil. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa Nº 77, de 26 de novembro de 2018b. Critérios e procedimentos para a produção, acondicionamento, conservação, transporte, seleção e recepção do leite cru em estabelecimentos registrados no serviço de inspeção oficial. Diário Oficial da União. 30 nov. 2018; Seção 1:10.

REVISTA DE MEDICINA VETERINÁRIA DO UNIFESO
v. 5, n. 1, (2025) | ISSN 2764-3263

6. Araújo CS, Vimercati WC, Macedo LL, Lima RR, Sant'ana CT, de Paula SCE, organizadores. Processamento térmico do leite: termização, pasteurização e UHT. In: Araújo CS, editor. Ciência e Tecnologia dos Alimentos. Belo Horizonte.

7. Gonçalves CA, Vieira LC. Obtenção e higienização do leite in natura. 1ª ed. Belém: Embrapa Amazônia Oriental; 2002. 27 p.

8. Brígido BM, Freitas VPS, Mazon EMA, Pisani B, Prandi MAG, Passos MHCR. Queijo Minas Frescal: avaliação da qualidade e conformidade com a legislação. RevInst Adolfo Lutz. 2004; 63(2):177-85.

9. Brasil. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Contaminantes em alimentos: atribuições da ANVISA na regulação de contaminantes em alimentos, incluindo método para definição de limites e principais regulamentos. Brasília; 14 dez. 2021b.

10. Ferreira SMS. Contaminação de alimentos ocasionada por manipuladores. Especialização em Qualidade em Alimento— Universidade de Brasília, Centro de Excelência em Turismo; mar 2006.

11. Forsythe SJ. Microbiologia da segurança dos alimentos. 2ª ed. Porto Alegre: Grupo A; 2013. E-book. ISBN 9788536327068.

12. Rodrigues LFS, Pavelquesi SLS, Ferreira ACO, Monteiro ES, Silva CMS, Silva IC, Orsi DC. Microbiological evaluation of industrialized and artisanal Minas fresh cheese commercialized in the Federal District, Brazil. Food Sci Technol. 2022.

13. Brasil. Presidência da República. Casa Civil. Lei nº 1.283, de 18 de dezembro de 1950. Dispõe sobre a inspeção industrial e sanitária dos produtos de origem animal. Diário Oficial da União, Brasília; 19 dez. 1950.

14. Brasil. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução nº 216, de 15 de setembro de 2004. Dispõe sobre Regulamento Técnico de Boas Práticas para Serviços de Alimentação. Brasília, DF; 2004.

15. Brasil. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 275, de 21 de outubro de 2002. Dispõe sobre o Regulamento Técnico de Procedimentos Operacionais Padronizados aplicados aos Estabelecimentos Produtores/Industrializadores de Alimentos e a Lista de Verificação das Boas Práticas de Fabricação em Estabelecimentos Produtores/Industrializadores de Alimentos. Diário Oficial da União, Brasília; 23 out. 2003.

16. Brasil. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Instrução Normativa - IN nº 161, de 1º de julho de 2022. Estabelece os padrões microbiológicos dos alimentos. Diário Oficial da União, Brasília; 6 jul. 2022.

17. Silva ND, Junqueira VCA, Silveira NF, Taniwaki MH, Gomes RAR, Okazaki MM. Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos e água. São Paulo: Editora Blucher; 2017.

18. Apolinário TCC, Santos G, Lavorato J. Avaliação da qualidade microbiológica do queijo Minas Frescal produzido por laticínios do estado de Minas Gerais. RevInst Laticínios Cândido Tostes. 2014; 69(6):433-42.

19. Coelho AF, Bayerl EAF, Bastianelli LFP, Miranda MM. Análise físico-química e microbiológica de queijos tipo minas frescal de diferentes origens do sul do Espírito Santo. Cadernos Camilliani. 2023; 20(4):75-93.