

Controle de qualidade em queijo minas padrão

Métodos físicos-químicos, microbiológicos e moleculares



Renata Golin Bueno Costa
Marta Fonseca Martins
Juliana França Monteiro de Mendonça
Maria de Fatima Borges

Editores Técnicos



*Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
Embrapa Agroindústria Tropical
Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento*

Controle de qualidade em queijo minas padrão

Métodos físico-químicos, microbiológicos e moleculares

*Renata Golin Bueno Costa
Marta Fonseca Martins
Juliana França Monteiro de Mendonça
Maria de Fatima Borges*

Editores Técnicos

Embrapa
Brasília, DF
2019

Exemplares desta publicação podem ser adquiridos na:

Embrapa Agroindústria Tropical

Rua Dra. Sara Mesquita 2.270, Pici
CEP 60511-110 Fortaleza, CE - Caixa Postal 3761
Fone: (85) 3391-7100 - Fax: (85) 3391-7109
www.embrapa.br/agroindustria-tropical
www.embrapa.br/fale-conosco

Unidade responsável pelo conteúdo e pela edição

Embrapa Agroindústria Tropical

Comitê de Publicações da Embrapa Agroindústria Tropical

Presidente

Gustavo Adolfo Saavedra Pinto

Secretária-executiva

Celli Rodrigues Muniz

Secretária-administrativa

Eveline de Castro Menezes

Membros

Marlos Alves Bezerra, Ana Cristina Portugal Pinto de Carvalho, Deborah dos Santos Garruti, Dheyne Silva Melo, Ana Iraidy Santa Brígida, Eliana Sousa Ximendes

Revisão de texto

José Cesamildo Cruz Magalhães

Normalização bibliográfica

Rita de Cássia Costa Cid

Capa

Ana Elisa Galvão Sidrim

Editoração eletrônica

Arilo Nobre de Oliveira

1ª edição

Publicação digitalizada (2019)

Todos os direitos reservados.

A reprodução não autorizada desta publicação, no todo ou em parte, constitui violação dos direitos autorais (Lei n. 9.610).

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Embrapa Agroindústria Tropical

Controle de qualidade em queijo minas padrão : métodos físico-químicos, microbiológicos e moleculares / Renata Golin Bueno Costa ... [et al.], editores técnicos. – Brasília, DF: Embrapa, 2019.

82 p. ; il. color. ; 15 cm x 21 cm.

ISBN 978-85-7035-920-9

1. Produtos lácteos. 2. Microbiologia alimentar. 3. Segurança de alimentos. 4. Metodologia. I. Costa, Renata Golin Bueno. II. Martins, Marta Fonseca. III. Mendonça, Juliana França Monteiro de. IV. Borges, Maria de Fatima. V. Embrapa Agroindústria Tropical.

CDD 664.001579

Autores

Denise Sobral

Engenheira de Alimentos, doutora em Ciência e Tecnologia de Alimentos, pesquisadora da Empresa de Pesquisa Agropecuária do Estado de Minas Gerais - Instituto de Laticínios Cândido Tostes, Juiz de Fora, MG

Gisela de Magalhães Machado Moreira

Engenheira de Alimentos, doutora em Ciência dos Alimentos, pesquisadora da Empresa de Pesquisa Agropecuária do Estado de Minas Gerais - Instituto de Laticínios Cândido Tostes, Juiz de Fora, MG

Jaqueline Flaviana de Oliveira Sá

Bacharela em Ciência e Tecnologia de Laticínios, mestrada em Ciência e Tecnologia de Leite e Derivados, pesquisadora da Empresa de Pesquisa Agropecuária do Estado de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG

João Pablo Fortes Pereira

Farmacêutico, mestre em Ciência e Tecnologia de Leite e Derivados, doutorando em Ciência e Tecnologia de Alimentos pela Universidade Federal de Viçosa, técnico em Alimentos e Laticínios do Departamento de Nutrição da Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora, MG

Juliana França Monteiro de Mendonça

Médica-veterinária, mestrada em Ciência e Tecnologia de Leite e Derivados, doutoranda da Universidade Federal Fluminense, RJ

Luiz Carlos Gonçalves Costa Júnior

Engenheiro-agrônomo, doutor em Ciências dos Alimentos, pesquisador da Empresa de Pesquisa Agropecuária do Estado de Minas Gerais - Instituto de Laticínios Cândido Tostes, Juiz de Fora, MG

Maria de Fatima Borges

Farmacêutica-Bioquímica, doutora em Tecnologia de Alimentos, pesquisadora da Embrapa Agroindústria Tropical, Fortaleza, CE

Marta Fonseca Martins

Bióloga, doutora em Genética e Melhoramento, pesquisadora da Embrapa Gado de Leite, Juiz de Fora, MG

Paulo Henrique Fonseca da Silva

Farmacêutico-Bioquímico, doutor em Ciência dos Alimentos, professor associado do Departamento de Nutrição da Universidade Federal de Juiz de Fora, MG

Renata Golin Bueno Costa

Engenheira de Alimentos, doutora em Ciência dos Alimentos, pesquisadora da Empresa de Pesquisa Agropecuária do Estado de Minas Gerais - Instituto de Laticínios Cândido Tostes, Juiz de Fora, MG

Apresentação

Existem mais de 1.000 variedades de queijos produzidos mundialmente, com uma produção que supera 14 milhões de toneladas. Esse produto destaca-se entre os derivados lácteos por ter alto teor de proteínas e outros nutrientes. No Brasil, surgiram muitas variedades, sendo algumas de expressão regional e outras com largo consumo no território nacional. Dentre essas variedades, destaca-se o queijo minas padrão. Em 2017, o Brasil produziu 82,9 mil kg de queijos dos tipos minas frescal e padrão, de um total de 1,14 milhão de quilogramas produzidos no país, o que movimentou mais de um bilhão de reais.

As primeiras fabricações do queijo minas padrão remontam ao século XIX, sendo um queijo tipicamente brasileiro, oriundo do queijo minas frescal, que é produzido em vários estados brasileiros. Os maiores problemas com a produção de queijo no Brasil estão relacionados às condições higiênico-sanitárias do leite produzido, às condições de fabricação (falta de padronização de metodologias de análise e procedimentos) e à ineficiência do sistema de refrigeração ao longo da cadeia.

Nesse contexto, este livro vem trazer uma valiosa contribuição para esse segmento e preencher uma lacuna nessa área. São apresentadas metodologias para análises físico-químicas e moleculares para o produto queijo minas padrão. Todas as metodologias são utilizadas pelas equipes de duas Unidades Descentralizadas da Embrapa (Agroindústria Tropical e Gado de Leite) e a equipe do tradicional Instituto de Laticínios Candido Tostes, vinculado à Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais – Epamig.

Lucas Antonio de Sousa Leite

Chefe-Geral da Embrapa Agroindústria Tropical

Sumário

Capítulo 1

Queijo minas padrão	9
---------------------------	---

Capítulo 2

Tecnologia de fabricação	11
--------------------------------	----

Capítulo 3

Amostragem para análises laboratoriais	17
--	----

Capítulo 4

Análises físico-químicas	19
Extrato seco (sólidos totais)	19
Compostos nitrogenados	23
Gordura	30
Cloreto de sódio	32
pH	38
Resíduo mineral fixo (cinzas)	40

Capítulo 5

Análise para determinação de teor de cálcio livre em queijo	43
Extração por prensagem da fase aquosa do queijo	43
Cálcio livre	46

Capítulo 6

Análises microbiológicas	49
Coliformes totais e termotolerantes	49
Contagem de <i>Staphylococcus</i> coagulase positivo e <i>Staphylococcus aureus</i>	52
<i>Salmonella</i> sp.	58
<i>Listeria monocytogenes</i>	64
<i>Escherichia coli</i> O157:H7	67

Capítulo 7

Detecção de patógenos por PCR em tempo real.....	71
Extração de DNA.....	72
Quantificação do DNA	73
PCR em tempo real.....	74

Referências	79
--------------------------	----

Capítulo 1

Queijo minas padrão

*Renata Golin Bueno Costa
Denise Sobral*

Os queijos minas, de origem tipicamente brasileira, começaram a ser fabricados no século XIX em Minas Gerais. Dentro dessa classe, encontra-se o queijo minas frescal, com alto teor de umidade e de consumo rápido. Entre os queijos curados ou maturados, encontram-se o minas padrão e o minas meia cura. Este último é um queijo de massa lavada e com sabor suave, características que o diferenciam do queijo minas padrão (Paula, 2011).

Tabela 1. Composição físico-química de diferentes tipos de queijos minas.

Composição	Minas frescal	Minas meia cura	Minas padrão
Umidade (%)	55–60	49–51	46–49
Gordura (%)	15–19	22–24	23–25
pH	5,0–6,3	5,1–5,3	5,0–5,2
Sal (%)	1,4–1,6	1,2–1,4	1,4–1,6

Fonte: Furtado e Lourenço Neto (1994).

O queijo minas padrão, originado no século XIX no estado de Minas Gerais, caracteriza-se por ser maturado, com uma massa mais firme e textura mais seca, o que o diferencia do queijo minas frescal. Também pode ser denominado minas curado, minas pasteurizado ou minas prensado (Furtado; Lourenço Neto, 1994).

O minas padrão é uma variação do queijo minas frescal, assim como os queijos artesanais das microrregiões mineiras do Serro, da Serra da Canastra, dentre outras, os quais apresentam características semelhantes; no entanto, são produzidos de forma artesanal com o emprego de leite cru como matéria-prima (Furtado, 2005).

O queijo minas padrão é definido como “queijo de massa crua ou semicozida, obtido por meio da coagulação do leite pasteurizado com coalho ou com outras enzimas coagulantes apropriadas, ou com ambos, complementada ou não pela ação de bactérias lácticas específicas, com a obtenção de uma massa coalhada, dessorada, prensada mecanicamente, salgada e maturada” (Brasil, 2017a). Algumas características do queijo estavam definidas no RISPOA de 1952, como: consistência semidura, tendendo à macia, de untura manteigosa, com algumas olhaduras mecânicas, cor branco-creme, homogênea, com odor suave, característico e sabor próprio, ácido, não picante, com crosta fina e amarelada (Brasil, 1952). Essa caracterização foi suprimida da versão em vigor (Brasil, 2017a). Apresenta formato cilíndrico, diâmetro variando de 12 cm a 15 cm, peso entre 0,7 kg a 1,2 kg e validade de 3 a 4 meses.

Capítulo 2

Tecnologia de fabricação

Renata Golin Bueno Costa

Denise Sobral

Juliana França Monteiro de Mendonça

A tecnologia de fabricação do queijo minas padrão segue basicamente o fluxograma descrito na Figura 1.

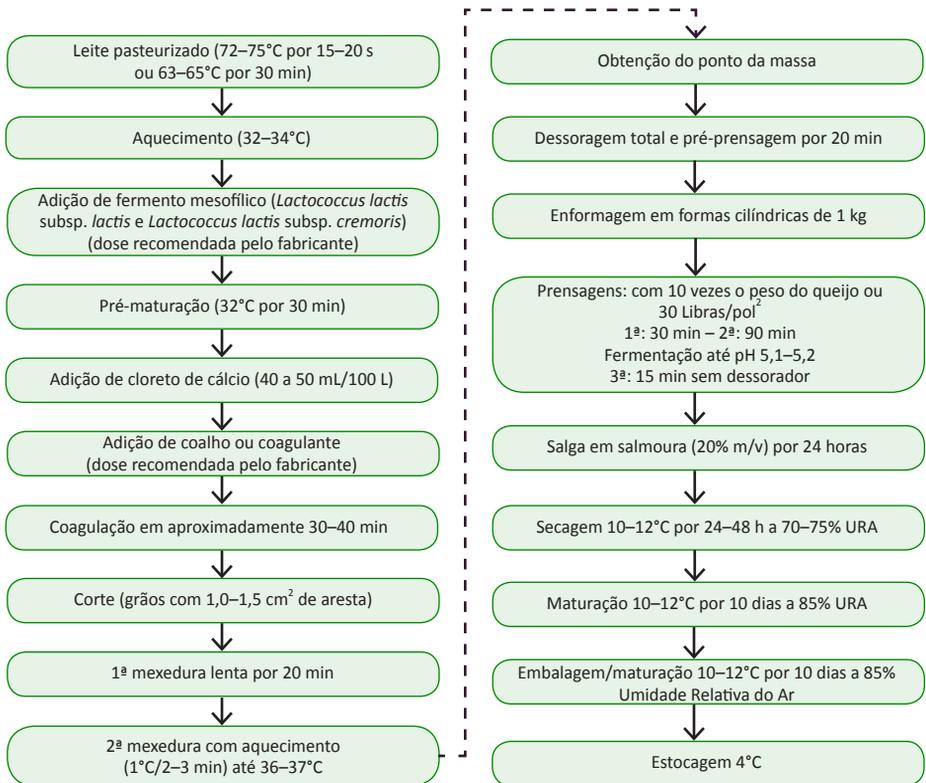


Figura 1. Fluxograma da fabricação do queijo minas padrão com leite pasteurizado.

Fonte: Furtado e Lourenço Neto (1994).

Para produzir queijo minas padrão, deve-se usar leite de boa qualidade, com acidez entre 0,14 e 0,18 g ácido láctico/100 mL, padronizado para 3,2–3,4% de matéria gorda e pasteurizado (72–75°C por 15–20 s ou 63–65°C por 30 min). O queijo pode ser fabricado com leite integral; no entanto, dependendo do teor de gordura do leite, pode ficar muito macio e deformar durante sua comercialização.

Após a pasteurização, o leite é resfriado a 32–34°C e adiciona-se o fermento mesofílico tipo O (Figura 2B) na dosagem recomendada pelo fabricante. Esse fermento, composto das bactérias *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* e *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*, está disponível no mercado na forma liofilizada. Essas culturas superconcentradas são desidratadas, por isso é necessário aguardar 30 min após a adição ao leite, etapa conhecida como pré-maturação. O fermento possui papel muito importante no queijo, sendo responsável pelo sabor levemente ácido e pela consistência pouco firme e quebradiça do queijo minas padrão.

Após esse tempo, o cloreto de cálcio 50% (m/v) é adicionado na proporção de 40 mL para 100 L de leite (Figura 2A). Como a solução também pode ser encontrada a 40%, deve-se verificar a dose recomendada pelo fabricante. O cloreto de cálcio é adicionado ao leite pasteurizado para repor os sais de cálcio insolubilizados na pasteurização. O cálcio é importante na formação e firmeza da coalhada. Com isso, diminuem-se as perdas de proteínas e gordura no soro durante o corte, que impactam no rendimento. Depois da adição do cloreto de cálcio e mexedura, verifica-se a temperatura do leite, que deve estar entre 32°C e 34°C, e adiciona-se o coalho na dose recomendada pelo fabricante, seja na forma líquida ou em pó. No momento da adição, o coalho deve ser diluído em água não clorada e adicionado lentamente ao leite sob leve agitação. A coagulação ocorre em aproximadamente 40 min. O corte deve ser lento e realizado com o auxílio de liras (horizontal e vertical) (Figuras 2C e 2D).

Os grãos obtidos devem possuir de 1,0 a 1,5 cm² de aresta, aproximadamente do tamanho de um grão de milho ou ervilha, também chamado de grão O2 (Figura 2E). Após o corte, realiza-se a mexedura com um garfo próprio (Figura 2F). A agitação deve ser lenta, durante 15–20 min. Caso haja quebra excessiva dos grãos, deve-se realizar repousos regulares. Após 20 min de mexedura, inicia-se o aquecimento lento, com elevação de 1°C a cada 2–3 min até atingir 36–37°C com agitação contínua (Figuras 2G e 2H).

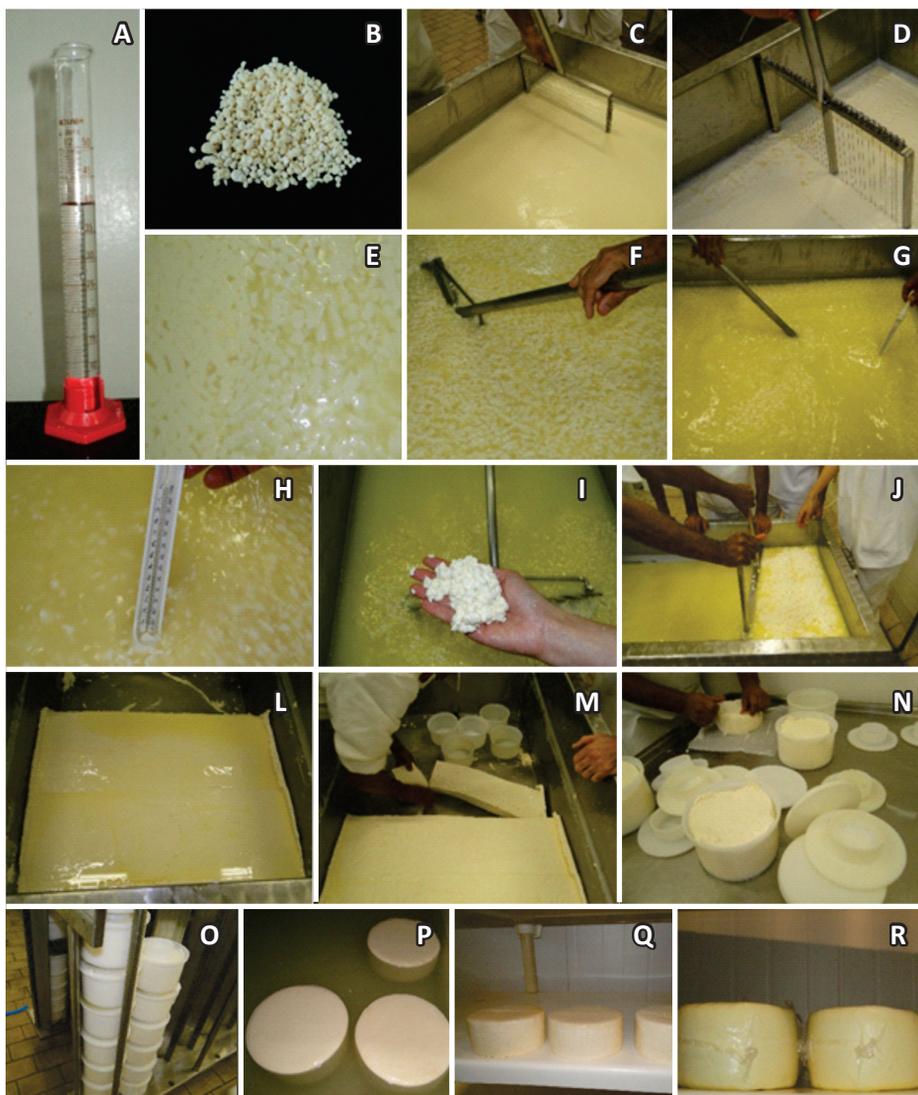


Figura 2. Etapas de produção de Queijo Minas padrão. (A) Cloreto de cálcio; (B) fermento mesofílico tipo O; (C) corte com a lira horizontal; (D) corte com a lira vertical; (E) tamanho do grão após o corte; (F) primeira mexedura da massa; (G) segunda mexedura com aquecimento da massa; (H) medição da temperatura de aquecimento da massa; (I) ponto da massa; (J) escoamento do soro da massa; (L) massa após pré-prensagem; (M) corte da massa; (N) enformagem da massa; (O) prensagem da massa; (P) salga dos queijos; (Q) maturação do queijo e formação da casca; (R) queijo embalado em película plástica termoencolhível.

O ponto da massa ocorre cerca de 40 min a 50 min após o corte da coalhada. A massa do queijo deve apresentar-se um pouco mais seca e macia (Figura 2I).

Após o ponto, a massa é empurrada para a extremidade do tanque ou colocada na drenoprensa e todo o soro é retirado (Figuras 2J e 2L). A massa é pré-prensada com o dobro do peso em relação à quantidade de massa por 15 min a 20 min (ou 40 a 50 Lb/pol² em drenoprensa).

O bloco de massa é cortado em pedaços de aproximadamente de 1 a 1,2 kg de massa (Figura 2M) e enformado em formas cilíndricas com dessoradores ou panos tipo morim (Figura 2N). O queijo é prensado primeiramente por 30 min com peso equivalente a dez vezes o seu peso (10 kg) ou 20 Lb/pol² (Figura 2O). Em seguida, os queijos são virados na forma e as posições invertidas. Os queijos que estão embaixo na prensa passam para a parte superior e vice-versa, para serem prensados novamente por mais 90 min com 30 Lb/pol² ou dez vezes o peso do queijo (10 kg). Ao final da prensagem ou assim que atinjam um pH de 5,1–5,2 (em torno de 3 horas de prensagem), os queijos são retirados da prensa e prensados novamente, porém sem dessoradores ou pano, durante cerca de 15 min com 30 Lb/pol² ou dez vezes o seu peso para que tenham um acabamento melhor. Em seguida, os queijos são levados para a salga em salmoura a 10–12°C, com 20% (m/v) de sal durante 24 h (Figura 2P). Após a salga, os queijos são secos em uma câmara a 10–12°C com umidade relativa do ar (URA) de aproximadamente 70% durante 24–48 h. Depois, são levados para as câmaras a 10–12°C com URA de aproximadamente 85% durante os dez primeiros dias, com viragem diária, para formação de casca (Figura 2Q). Após esse período, os queijos são embalados em película plástica termoencolhível (Figura 2R). A maturação deve prosseguir por mais dez dias em câmara a 10–12°C para desenvolvimento de sabor e consistência. Caso não seja desejada a formação de casca, o queijo pode ser embalado em película termoencolhível após a secagem e maturado já embalado por 20 dias. Encerrado este período de maturação, os queijos podem ser estocados ou comercializados em temperatura entre 2–4°C.

Os problemas com a produção de queijo no Brasil estão relacionados às condições higiênico-sanitárias do leite utilizado, às condições de fabricação e à ineficiência do sistema de refrigeração ao longo da cadeia produtiva, que agravam a situação e criam condições de contaminação e desenvolvimento de microrganismos.

Dentre os produtos derivados do leite, o queijo é considerado um veículo frequente de patógenos e, em alguns casos, não sofre processo de maturação. A contaminação microbiana desse produto assume destacada relevância tanto para a indústria, pelas perdas econômicas, como para a saúde pública, pelo risco de causar doenças de origem alimentar (Feitosa et al., 2003). A qualidade e durabilidade de um produto dependem, em grande parte, da matéria-prima utilizada na sua fabricação. É difícil melhorar a qualidade de um produto se o número de microrganismos inicialmente presentes no leite *in natura* é elevado.

Além da matéria-prima, destacam-se como pontos críticos no processamento desses queijos o tanque de coagulação e a salmoura. Durante a coagulação, o número de bactérias presentes no leite, sejam lácteas ou contaminantes, aumenta cerca de dez vezes. Ainda que o queijo não seja recontaminado durante o processamento, pode haver recontaminação durante sua permanência na salmoura, pois esta é capaz de permitir a sobrevivência de microrganismos osmotolerantes (Nero et al., 2005). Este fato é atestado pela sobrevivência, por várias semanas, de *Escherichia coli* O157:H7 em salmouras com 20% (m/v) de sal (Ingham et al., 2000).

Bactérias do grupo coliformes são indicativas de condições higiênico-sanitárias inadequadas durante o processamento de queijos, podendo degradar toda a lactose dentro de 24 h a 48 h e provocar o defeito conhecido como estufamento precoce (Sangaletti, 2007). Além das bactérias deterioradoras, diversos surtos de doenças de origem alimentar têm sido associados à ingestão de queijos, em razão, principalmente, da presença de bactérias patogênicas como *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Bacillus cereus*, *Listeria monocytogenes* e *Salmonella* sp. (Salotti et al., 2006).

Falhas ocorridas durante todo o processamento, aliadas a temperaturas inadequadas de conservação durante a comercialização, são fatores que têm contribuído para venda de queijos fora dos padrões regulamentares (Sangaletti, 2007). A dificuldade de exportação e os principais problemas com a produção de queijos no Brasil estão relacionados principalmente com a baixa qualidade do leite produzido, as péssimas condições de fabricação e a falta ou ineficiência da cadeia de frio. Além disso, há o predomínio da utilização de metodologias clássicas para análises microbiológicas de patógenos, o que inviabiliza a liberação rápida do produto para o mercado. Isso ocorre devido à morosidade na obtenção dos resultados, problema que poderia ser resolvido caso metodologias alternativas, mais rápidas e muitas vezes mais sensíveis, fossem utilizadas.

Capítulo 3

Amostragem para análises laboratoriais

Luiz Carlos Gonçalves Júnior

Tão importante quanto as análises é a etapa que as precede, ou seja, a coleta ou colheita das amostras. Embora existam particularidades entre amostras de produtos lácteos fluidos, cremosos, pastosos, desidratados, concentrados, gelados e sólidos, dois princípios devem ser considerados em todo plano amostral: a homogeneidade e a representatividade das amostras.

Especificamente para a retirada de amostras de queijos, pode-se recorrer ao emprego de sondas de aço inoxidável, que facilitam pelo comprimento delas e, quando necessário, também cortam os produtos, uma vez que possuem suas bordas afiadas para essa prática (Figura 1). Para análises microbiológicas, a sonda de coleta deve estar estéril. Usualmente, a porção coletada deverá conter as camadas superficiais do queijo, como casca (caso o queijo seja maturado sem embalagem). Se a opção de amostragem for por cortes, estes devem ser feitos em formato de cunhas.

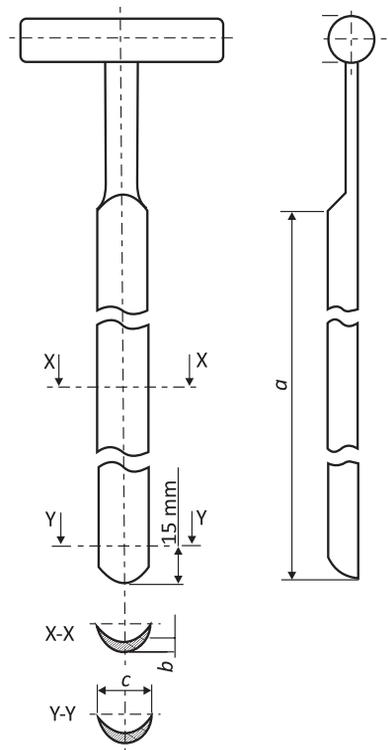
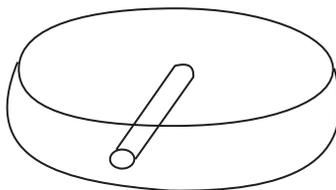


Figura 1. Modelo de sonda para amostragem de queijo.

Fonte: *International Dairy Federation* (2008).

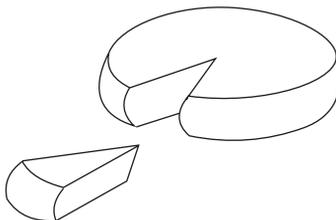
Nas Figuras 2 e 3 são apresentadas técnicas para coleta de amostra por sonda e corte, respectivamente.

Figura 2. Técnica para coleta de amostra de queijo minas padrão, de formato cilíndrico, com emprego de sonda.



Fonte: *International Dairy Federation* (2008).

Figura 3. Técnica para coleta de amostra de queijo minas padrão, com seção circular, empregando-se corte em formato de cunha.



Imediatamente após a coleta, caso as amostras não estejam em embalagem definitiva (plástico termoencolhível), como, por exemplo, aquelas vindas diretamente ao laboratório após a fabricação, deverão ser acondicionadas em recipiente de formato e tamanho adequados, sem compressão e mantidas entre 8–10°C por tempo suficiente para obtenção de consistência adequada. Devem ser retiradas da refrigeração 20-30 min antes das análises e mantidas em temperatura ambiente. Alternativamente, a amostra pode ser envolvida em papel alumínio para as análises físico-químicas e em sacos plásticos estéreis para as análises microbiológicas.

Em nenhuma situação, a quantidade de amostra coletada poderá ser inferior a 100 g, massa essa suficiente para realização das análises.

As amostras deverão ser acompanhadas por uma ficha assinada pelo responsável, contendo, no mínimo, as seguintes informações:

- Local, data e hora da coleta.
- Código de identificação.
- Indicação de que a amostra é ou não proveniente de subamostras.
- Local de destino da amostra, quando for o caso.

Capítulo 4

Análises físico-químicas

*Luiz Carlos Gonçalves Costa Júnior
Gisela de Magalhães Machado Moreira*

Extrato seco (sólidos totais)

Método gravimétrico

O procedimento aqui descrito encontra-se na referência Brasil (2017b).

Fundamento

Consiste na perda da umidade por dessecação e pesagem do extrato seco total de uma quantidade determinada de amostra. Essa análise é muito importante no controle de qualidade da indústria, de modo a padronizar o processo produtivo e a composição do produto. Outro aspecto importante é enquadrar o teor de umidade do queijo de acordo com os limites que a legislação preconiza conforme a classificação do queijo, mesmo sem ainda constar um regulamento técnico de identidade e qualidade para o queijo minas padrão. Embora seja o método de referência para análise em queijo, empregando-se a metodologia citada, ele requer mais de 6 horas para a obtenção do resultado final, o que muitas vezes inviabiliza seu uso, razão pela qual a indústria opta por empregar métodos mais rápidos e práticos, como por infravermelho ou micro-ondas, em que a tomada de decisão precisa ser imediata sobre a composição dos sólidos totais dos queijos fabricados e/ou ingredientes, como massa de queijo para produção de derivados, a exemplo do queijão.

Material e equipamentos necessários

- Estufa regulada para $102 \pm 1^\circ\text{C}$.
- Dessecador com sílica-gel ou cloreto de cálcio em escamas.

- Balança analítica ou semianalítica, capacidade para 150 a 200 g, intervalo de medição de 0,1 mg.
- Espátula em aço inoxidável.
- Cadinho ou cápsula de alumínio contendo areia purificada e bastão de vidro.

Procedimento

- Colocar até a metade de uma cápsula de alumínio ou placa de Petri, aproximadamente 25 g de areia purificada e um bastão de vidro apoiado na borda do recipiente.
- Colocar a espátula em estufa sob temperatura de $102 \pm 1^\circ\text{C}$ por 1 h, depois retirar e deixar no dessecador por aproximadamente 45 min.
- Pesquisar o conjunto cápsula/areia/bastão de vidro e anotar a massa (T).
- Pesquisar direto na cápsula, com auxílio de espátula, aproximadamente 3 g da amostra triturada previamente e misturar a areia com o queijo até a obtenção de uma mistura homogênea. A mistura da areia com queijos duros pode ser facilitada pela adição de aproximadamente 3 mL de água. Anotar a massa (Pi).
- Levantar a amostra na cápsula para estufa a $102 \pm 1^\circ\text{C}$ por 2 h, retirar e levar imediatamente para esfriar em dessecador por, no mínimo, 45 min.
- Pesquisar e anotar a massa.
- Retornar com a amostra na cápsula para a estufa a $102 \pm 1^\circ\text{C}$ por mais 1 h, retirar e levar imediatamente para esfriar no dessecador por, no mínimo, 45 min.
- Pesquisar e anotar a massa.
- Repetir a operação até que a diferença entre duas pesagens consecutivas seja menor ou igual a 0,5 mg. Anotar a massa final (P_f).

Interpretação do resultado

Calcular o teor de extrato seco por meio da fórmula abaixo:

$$\% \text{ ES} = \frac{P_f - T}{P_i - T} \times 100$$

Sendo:

% ES: teor de extrato seco, em % (m/m);

Pf: resultado da última pesagem, em g;

Pi: resultado da pesagem inicial, após adição da amostra, em g;

T: tara do recipiente com areia e bastão de vidro, em g.

Observações

Se a determinação do extrato seco for realizada em cadinho de porcelana, este poderá ser utilizado para a determinação de cinzas.

Com queijos que se fundem como uma massa cerácea, é recomendável utilizar um banho de vapor ou água fervente antes da amostra ser levada à estufa de secagem a $102 \pm 1^\circ\text{C}$. O conteúdo da cápsula deve ser misturado completamente com bastão de vidro para prevenir a formação de uma superfície endurecida. Colocar o bastão dentro da cápsula, enxugando o fundo do recipiente da mesma com papel absorvente. Transferir a cápsula com sua respectiva tampa para estufa de secagem a $102 \pm 1^\circ\text{C}$ durante 2 horas.

Método micro-ondas

O procedimento aqui descrito encontra-se na referência (Costa Júnior et al., 2000).

Fundamento

Consiste na perda de umidade por mudança de polaridade no campo elétrico, gerado pelas micro-ondas, fazendo com que haja atrito intermolecular e oscilação dentro dos próprios eixos das moléculas. Isto gera produção de calor dentro e através da amostra, que faz com que ela perca água. Essa adaptação analítica viabiliza o emprego do método na rotina industrial, por ser rápido e de menor custo, quando comparado ao método de referência.

Material e equipamentos necessários

- Forno de micro-ondas doméstico.
- Dessecador com sílica-gel ou cloreto de cálcio em escamas.
- Balança analítica ou semianalítica, capacidade para 150 a 200 g, intervalo de medição de 0,1 mg.

- Espátula de aço inoxidável.
- Pinça metálica.
- Placa de Petri.
- Papel de fibra de vidro.

Procedimento

- Preparar um conjunto contendo uma metade de placa de Petri e duas folhas de papel de fibra de vidro com o lado mais liso de cada uma das folhas para fora.
- Levar ao forno de micro-ondas com potência de 800 W por 2 min.
- Esfriar em dessecador até a temperatura ambiente.
- Anotar a massa correspondente à tara do conjunto (T).
- Espalhar, com o auxílio de uma espátula, aproximadamente 3 gramas de amostra (P_1) em uma das folhas do papel de fibra de vidro e cobri-la com a outra folha, utilizando uma pinça metálica, de modo que cada face mais porosa do papel fique em contato com a amostra, acondicionando-a como um “sanduíche”.
- Levar ao forno de micro-ondas em tempo e potência definidos de acordo com o tipo de amostra (conforme Tabela 1).
- Esfriar em dessecador até a temperatura ambiente.
- Pesar e anotar a massa (P_2).

Tabela 1. Potência e tempo de tratamento para diferentes tipos de queijos.

Queijo	Potência (W)	Tempo (min)
Alta umidade	525	4–8
	665	4
Média umidade	665–800	8
Baixa umidade	665	8
	800	4

Interpretação do resultado

Calcular o teor de extrato seco por meio da fórmula:

$$\% \text{ ES} = \frac{(P_2 - T) \times 100}{P_1}$$

Sendo:

% ES: teor de extrato seco, em % (m/m);

P_2 : resultado da pesagem após secagem no forno de micro-ondas;

P_1 : massa da amostra utilizada na análise;

T: tara do recipiente contendo meia placa de Petri e folhas de papel de fibra de vidro.

Compostos nitrogenados

Fracionamento dos compostos nitrogenados

O procedimento aqui descrito encontra-se na referência (Pereira et al., 2001).

Soluções e reagentes

- Citrato de sódio 0,5 mol/L S.R.
- Ácido clorídrico 1,41 mol/L S.R.
- Ácido tricloroacético 24% (m/v) S.R.
- Antiespumante (talco, parafina ou silicone).

Vidrarias

- Proveta, capacidade 100 mL.
- Balão volumétrico, capacidade 100 mL e 200 mL.
- Pipeta graduada capacidade 20 mL, intervalo de graduação de 0,1 mL.
- Pipetas volumétricas, capacidades de 5 mL e 10 mL.
- Funil de vidro.
- Béqueres, capacidades 100 mL e 250 mL.

Material e equipamentos necessários

- Balança semianalítica ou analítica.
- Processador de alimentos.
- Medidor de pH.
- Copo para processador de alimentos, capacidade 500 mL.

- Espátula de aço inoxidável.
- Funil de vidro, haste longa, ângulo de 60°, diâmetro de 10 cm.
- Haste com base e pinças duplas para bureta.
- Haste com base e suporte para funil de vidro.
- Papel de filtro quantitativo para precipitados gelatinosos, baixo teor de cinzas, diâmetro de 12,5 cm.
- Pipetador de borracha.
- Pisseta plástica, capacidade 500 mL.
- Termômetro com escala de 0 a 100°C e intervalo de graduação de 1°C.

Procedimento

A. Extração

- Picar todo o queijo em pequenos cubos ou retirar uma amostra não inferior a 100 g, preferencialmente com o auxílio de uma sonda.
- Bater em processador de alimentos até formação de uma massa uniforme.
- Pesar com exatidão, utilizando-se balança analítica ou semianalítica, 10 g do queijo triturado, diretamente em um copo de processador.
- Adicionar 80 mL de água destilada a 40–45°C e 40 mL de solução de citrato de sódio 0,5 mol/L.
- Bater no processador por 7 min e movimentar cuidadosamente o copo do processador para facilitar o desaparecimento da espuma.
- Transferir quantitativamente a suspensão de queijo para um balão volumétrico de 200 mL, fazendo várias lavagens no copo processador, com pequenos volumes de água destilada até que toda a amostra seja passada para o balão volumétrico.
- Acrescentar água destilada em quantidade que não ultrapasse a marca de referência do balão volumétrico.
- Resfriar o balão volumétrico em água corrente até 20°C.
- Completar o volume com água destilada até a marca de referência do balão volumétrico.
- Inverter o balão várias vezes para uniformizar a suspensão.

B. Fracionamento para determinação de nitrogênio solúvel em pH 4,6

- Medir exatamente 100 mL da suspensão e transferir para um béquer de 250 mL.
- Adicionar, com o auxílio de um pipetador de borracha, 10 mL de solução de ácido clorídrico 1,41 mol/L S.R.
- Aguardar 5 min.
- Acrescentar 15 mL de água destilada.
- Filtrar através de papel-filtro.
- Reservar o filtrado para determinação posterior.

C. Fracionamento para determinação de nitrogênio solúvel em ácido tricloroacético (TCA) 12%

- Medir exatamente 50 mL da suspensão e transferir para um béquer de 250 mL.
- Adicionar, com o auxílio de um pipetador de borracha, 50 mL de solução de ácido tricloroacético 24% (m/v) S.R.
- Aguardar 15 min.
- Filtrar através de papel-filtro.
- Reservar o filtrado para determinação posterior.

Método de Kjeldahl

O procedimento aqui descrito encontra-se na referência Brasil (2017b).

Fundamento

O método desenvolve-se em três etapas. Na primeira, promove-se a oxidação (digestão) da amostra pelo ácido sulfúrico a quente, em presença de catalisadores, rompendo a estrutura proteica para a liberação do nitrogênio sob a forma de sais de amônio. O resíduo obtido desta etapa é adicionado, numa segunda fase, de hidróxido de sódio, liberando-se amônia, destilada e captada por uma solução de ácido bórico (adicionado de indicadores). Da reação, forma-se metaborato de amônio, o qual será titulado por neutralização com ácido clorídrico, representando a fração nitrogenada que se deseja determinar.

O método de referência também demanda tempo, estação analítica especializada, analistas e equipamentos específicos, o que muitas vezes inviabiliza o emprego em escala industrial.

Soluções e reagentes

- Sulfato de potássio P.A.
- Sulfato de cobre P.A.
- Ácido sulfúrico concentrado P.A.
- Hidróxido de sódio 35% (m/v) S.R.
- Ácido ortobórico 5% (m/v) contendo indicador misto para Kjeldahl S.R.
- Ácido clorídrico 0,05 mol/L S.V.

Vidrarias

- Balão de Kjeldahl ou tubo para digestão.
- Frasco Erlenmeyer, boca estreita, capacidade 125 mL.
- Pipetas volumétricas, capacidades 5 mL e 10 mL.
- Pipeta graduada, capacidade 10 mL, ou pipetador automático, especial para ácido.
- Bureta, capacidade 25 mL, intervalo de graduação de 0,1 mL.

Material e equipamentos necessários

- Digestor de Kjeldahl.
- Destilador micro-Kjeldahl.
- Frasco com água destilada em temperatura ambiente.
- Estante para balões de Kjeldahl.
- Suporte para bureta.

Determinação de nitrogênio total

Procedimento

- Transferir 5 mL da suspensão de queijo, como consta em “**Fracionamento dos compostos nitrogenados**” (5 mL de água destilada para a prova em branco) para um balão de Kjeldahl ou tubo de digestão micro Kjeldahl.

- Adicionar 1,5 g de sulfato de potássio P.A., aproximadamente 0,1 g de sulfato de cobre P.A. e 3 mL de ácido sulfúrico P.A.
- Agitar cuidadosamente e levar ao digestor em capela de exaustão.
- Digerir em temperatura moderada (aproximadamente 50°C) no início e, após escurecimento do material, elevar a temperatura até 380–400°C ou até 470°C em balões com exaustão a trompa de vácuo.
- Após o material ficar claro (esverdeado), manter o aquecimento por aproximadamente mais 30 min.
- Retirar do digestor e aguardar resfriamento até a temperatura ambiente.
- Adicionar água destilada (30 mL) pelas paredes do balão ou tubo, até dissolução do digerido, aquecendo se necessário.
- Transferir o digerido ou acoplar o tubo ao destilador.
- Encaixar na saída do condensador um Erlenmeyer de 250 mL contendo 10 mL de solução de ácido ortobórico 4% (m/v) S.R. com indicador misto.
- Adicionar 15 mL de hidróxido de sódio 35% (m/v) S.R.
- Destilar por arraste de vapor até recolhimento de aproximadamente 100 mL do destilado.
- Titular o destilado por uma solução de ácido clorídrico 0,05 mol/L S.V. até ponto final detectável pela mudança de coloração verde a roxa.
- Anotar os volumes gastos (A) e (B) para as determinações na amostra e na prova em branco, respectivamente.

Interpretação do resultado

Calcular o teor percentual de nitrogênio total por meio da fórmula abaixo:

$$\% \text{ NT} = \frac{(A - B) \times C_i \times f_c \times 1,4}{g}$$

Sendo:

% NT: teor percentual (m/m) de nitrogênio total;

A: volume gasto na titulação da amostra;

B: volume gasto na titulação da prova em branco;

C_i: concentração (mol/L) da solução de ácido clorídrico;

f_c: fator de correção para a solução de ácido clorídrico;

g: porção alíquota da amostra (10/200 × 5 = 0,25).

Observação

Para preparar a solução de ácido ortobórico com indicador, seguir as seguintes etapas:

A. Ácido bórico (H_3BO_3) 4% (m/v) S.R. (1 litro de solução)

- Pesar 40 g de ácido bórico P.A. em um béquer de 500 mL.
- Adicionar ao béquer aproximadamente 300 mL de água destilada.
- Aquecer, agitando com um bastão de vidro, até completa dissolução do ácido.
- Transferir, quantitativamente, para um balão volumétrico de 1.000 mL.
- Fazer aproximadamente 5 lavagens no béquer com pequenas porções de água destilada, transferindo a solução para o balão.
- Completar o volume com água destilada.
- Tampar o balão e misturar por inversões.

B. Indicador misto (100 mL de solução)

- Pesar 200 mg de vermelho de metila P.A. e 100 mg de azul de metileno P.A. em um béquer de 250 mL.
- Dissolver os indicadores em 80 mL de etanol 97% (v/v) P.A.
- Filtrar para um balão volumétrico de 100 mL, utilizando-se papel-filtro.
- Completar o volume do balão para 100 mL.
- Transferir a solução preparada para um frasco, de preferência âmbar.

A mistura ácido bórico com o indicador é preparada adicionando-se 15 mL de indicador misto a cada litro de ácido bórico 4%.

Determinação de nitrogênio solúvel em pH 4,6

Procedimento

- Transferir 5 mL do filtrado para fracionamento do nitrogênio solúvel em pH 4,6 para um balão de Kjeldahl ou tubo de digestão.
- Prosseguir conforme técnica descrita em “**Determinação de nitrogênio total**”.

- **Interpretação do resultado**

Calcular o teor percentual de nitrogênio solúvel em pH 4,6 por meio da fórmula abaixo:

$$\% \text{NS}_{\text{pH } 4,6} = \frac{(A - B) \times \text{Ci} \times \text{fc} \times 1,4}{g}$$

Sendo:

$\% \text{NS}_{\text{pH } 4,6}$: teor percentual (m/m) de nitrogênio solúvel em pH 4,6;

A: volume gasto na titulação da amostra;

B: volume gasto na titulação da prova em branco;

Ci: concentração (mol/L) da solução de ácido clorídrico;

fc: fator de correção para a solução de ácido clorídrico;

g: porção alíquota da amostra ($10/200 \times 100/125 \times 5 = 0,2$).

Determinação de nitrogênio solúvel em ácido tricloroacético (TCA) 12%

Procedimento

- Transferir 5 mL do filtrado para fracionamento do nitrogênio solúvel em TCA 12% para um balão de Kjeldahl ou tubo de digestão.
- Prosseguir conforme técnica descrita em “**Determinação de nitrogênio total**”.

Interpretação do resultado

Calcular o teor percentual de nitrogênio solúvel em TCA 12% por meio da fórmula abaixo:

$$\% \text{NS}_{\text{TCA } 12\%} = \frac{(A - B) \times \text{Ci} \times \text{fc} \times 1,4}{g}$$

Sendo:

$\% \text{NS}_{\text{TCA } 12\%}$: teor percentual (m/m) de nitrogênio solúvel em TCA 12%;

A: volume gasto na titulação da amostra;

B: volume gasto na titulação da prova em branco;

Ci: concentração (mol/L) da solução de ácido clorídrico;

fc: fator de correção para a solução de ácido clorídrico;

g: porção alíquota da amostra ($10/200 \times 50/100 \times 5 = 0,125$).

Gordura

Fundamento

A determinação da gordura do queijo baseia-se na sua separação e quantificação por meio do tratamento da amostra com ácido sulfúrico e álcool isoamílico. O ácido dissolve as proteínas que estão ligadas à gordura, diminuindo a viscosidade do meio, aumentando a densidade da fase aquosa e fundindo a gordura devido à liberação de calor proveniente da reação, o que favorece a separação da gordura pelo extrator (álcool isoamílico). A leitura é feita na escala graduada do butirômetro, após centrifugação e imersão em banho-maria.

O método butirométrico é muito útil e empregado nos laboratórios das indústrias, pois é simples de ser executado, não requer custo elevado e emprega reagentes similares aos da análise de gordura em leite e creme, que as queijarias mais fazem. A única recomendação é para compra de butirômetros de qualidade, preferencialmente os originais e/ou aqueles que possuam certificação, pois as escalas podem gerar erros que desabonam o resultado encontrado e podem comprometer a composição dos queijos se houver erro analítico.

Método Van Gulik

O procedimento aqui descrito encontra-se na referência Brasil (2017b).

Soluções e reagentes

- Ácido sulfúrico $d_{20} = 1.825$ g/L.
- Álcool isoamílico R $d_{20} = 811$ g/L.

Vidrarias

- Butirômetro Van Gulik, especial para queijo.
- Pipeta graduada, capacidade 1 mL, ou pipetador automático, especial para o álcool.
- Pipeta volumétrica, capacidade 5 mL.
- Pipeta graduada, capacidade 10 mL, ou pipetador automático, especial para o ácido.

Material e equipamentos necessários

- Balança analítica, capacidade 150 a 200 g, intervalo de medição de 0,1 mg.
- Banho-maria regulado para 65 a 66°C.
- Centrífuga de Gerber.
- Espátula de aço inox.
- Frasco com água destilada, 60 a 70°C.
- Estante para butirômetro.
- Termômetro com escala de 0 a 100°C, intervalo de graduação de 1°C.

Procedimento

- Pesar rigorosamente 3 g da amostra no copinho do butirômetro de Van Gulik e adaptá-lo ao butirômetro.
- Colocar 5 mL de água destilada a 60–70°C no butirômetro.
- Transferir lentamente para o butirômetro 10 mL de ácido sulfúrico ($d_{20} = 1.825 \text{ g/L}$).
- Limpar o gargalo com papel absorvente e tampar.
- Envolver em toalha e agitar vigorosamente, alternando com inversões em banho-maria a 60–65°C por aproximadamente 3 min cada, até a completa dissolução das proteínas.
- Adicionar 1 mL de álcool isoamílico ($d_{20} = 811 \text{ g/L}$) e água destilada quente até o número 30 da escala.
- Limpar o gargalo com papel absorvente, tampar e agitar vigorosamente.
- Centrifugar por 4–5 min.
- Deixar em banho-maria (65–66°C) por 2–3 min.
- Fazer a leitura em escala própria do butirômetro. A leitura é feita por diferença entre os meniscos superior e inferior: Ex.: 38 - 05 = 33% de gordura.

Interpretação do resultado

Resultado direto em % (m/m).

Cloreto de sódio

Fundamento

No doseamento nas cinzas ocorre reação do nitrato de prata com os cloretos, em presença de cromato de potássio como indicador, até mudança da coloração de amarelo para marrom. A reação deve desenvolver-se em pH ajustado. Embora o pH seja ajustado, não há necessidade de medi-lo. Ressalta-se no fundamento pelo fato de se ter abaixado o pH com ácido nítrico para dissociar os cloretos e, em seguida, aumentá-lo para dar continuidade à quantificação dos cloretos sem comprometer a análise. Nos doseamentos na substância, a quantificação dos cloretos é feita por meio de uma titulação pelo resto, em que se empregam dois padrões: o nitrato de prata, que, adicionado em excesso, reage com os cloretos do queijo, e o tiocianato de potássio, pelo qual se titula o nitrato de prata restante, em presença de sulfato férrico amoniacal.

Método de doseamento nas cinzas

O procedimento aqui descrito encontra-se na referência Brasil (2017b).

Soluções e reagentes

- Nitrato de prata 0,1 mol/L S.V.
- Cromato de potássio 5% (m/v) S.I.
- Ácido nítrico R.
- Carbonato de cálcio R.

Vidrarias

- Proveta, capacidade 100 mL, intervalo de graduação de 1 mL.
- Balão volumétrico, capacidade 100 mL.
- Funil de vidro.
- Erlenmeyer, capacidade 125 mL.
- Pipeta graduada, capacidade 5 mL, intervalo de graduação de 0,5 mL.
- Pipeta volumétrica, capacidade 20 mL.
- Bureta, capacidade 10 mL, intervalo de graduação de 0,05 mL.
- Cadinho de porcelana contendo as cinzas da análise anterior.

Material necessário

- Bastão de vidro.
- Frasco com água destilada a 85–95°C.
- Frasco com água destilada em temperatura ambiente.
- Suporte para bureta.
- Suporte para funil.
- Papel-filtro quantitativo.
- Termômetro com escala de 0 a 100°C, intervalo de graduação de 1°C.

Procedimento

- Colocar no cadinho que contém as cinzas aproximadamente 90 mL de água destilada muito quente (85–95°C) em 3 a 4 porções.
- Adicionar 2 gotas de ácido nítrico R na primeira porção de água destilada.
- Misturar cada porção com bastão de vidro e filtrar, através de papel-filtro, para um balão volumétrico de 100 mL.
- Transferir o resíduo para o funil juntamente com a última porção.
- Esfriar em água corrente e completar o volume com água destilada fria.
- Tampar e misturar por inversões.
- Transferir 50 mL de água destilada para outro balão volumétrico de 100 mL, acrescentar 2 gotas de ácido nítrico R, completar o volume do balão com água destilada fria, tampar e misturar por inversão (prova em branco).
- Transferir 20 mL do filtrado para Erlenmeyer de 125 mL.
- Transferir 20 mL da prova em branco para outro Erlenmeyer de 125 mL.
- Adicionar aproximadamente 0,5 g de carbonato de cálcio.
- Acrescentar 3 a 5 gotas de solução de cromato de potássio a 5% (m/v) S.l.
- Titular por uma solução de nitrato de prata 0,1 mol/L S.V. até ponto final detectável pelo aparecimento de coloração alaranjada.
- Anotar o volume gasto.

Interpretação do resultado

Calcular o teor de cloreto de sódio em % (m/m) por meio da fórmula abaixo:

$$\% \text{ NaCl} = \frac{(A - B) \times C_i \times f_c \times 5,845}{g}$$

Sendo:

% NaCl: teor de cloreto de sódio em % (m/m);

A: volume de solução de nitrato de prata gasto na titulação da amostra;

B: volume de solução de nitrato de prata gasto na titulação da prova em branco;

C_i: concentração da solução de nitrato de prata, em mol/L;

f_c: fator de correção da solução de nitrato de prata;

g: massa da porção alíquota da amostra (5/100 × 20 = 1,0).

Métodos de doseamento na substância

O procedimento aqui descrito encontra-se na referência Brasil (2017b).

Soluções e reagentes

- Nitrato de prata 0,1 mol/L S.V.
- Tiocianato de potássio 0,1 mol/L S.V.
- Sulfato férrico amoniacal (sulfato de ferro III e amônio) 34% (m/v) S.I.
- Ácido nítrico 6 mol/L (d₂₀ = 1.200 g/l) S.R.
- Hidróxido de sódio 1 mol/L S.R.

Vidrarias

- Proveta, capacidade 100 mL, intervalo de graduação de 1 mL.
- Béquer, capacidade 100 mL.
- Balão volumétrico, capacidade 100 mL.
- Funil de vidro.
- Frasco Erlenmeyer, capacidade 250 mL.
- Pipetas volumétricas, capacidade 5 mL e 50 mL.
- Pipeta graduada, capacidade 5 mL, intervalo de graduação de 0,5 mL.
- Bureta, capacidade 10 mL, intervalo de graduação de 0,05 mL.

Equipamento e material necessários

- Balança analítica, capacidade 150 a 200 g, intervalo de medição de 0,1 mg.
- Bastão de vidro.
- Espátula de aço inox.
- Frasco com água destilada a 30–40°C.
- Algodão hidrófilo.
- Suporte para bureta.
- Suporte para funil.
- Termômetro com escala de 0 a 100°C, intervalo de graduação de 1°C.

Procedimento

- Pesar 1,17 g de amostra em um béquer de 100 mL.
- Colocar aproximadamente 10 mL de água destilada morna (30–4°C).
- Misturar com bastão de vidro e transferir para o balão volumétrico de 100 mL.
- Lavar o béquer com aproximadamente 40 mL da mesma água, em 3 a 4 porções, transferindo, na última porção, todo o resíduo para o balão.
- Acrescentar 5 mL de hidróxido de sódio 1 mol/L, S.R.
- Tampar e misturar vigorosamente até completa dissolução das proteínas.
- Esfriar em água corrente e adicionar, lentamente, 5 mL de ácido nítrico 6 mol/L ($d_{20} = 1.200$ g/L), S.R.
- Decantar a emulsão por 10 min.
- Completar o volume com água destilada, tampar e misturar por inversões.
- Decantar a mistura por 10 min.
- Filtrar, através de algodão hidrófilo, para Erlenmeyer de 250 mL.
- Transferir 50 mL de água destilada para outro balão volumétrico de 100 mL, acrescentar 5 mL de hidróxido de sódio 1 mol/L S.R. e 5 mL de ácido nítrico 6 mol/L ($d_{20} = 1.200$ g/L) S.R.; completar o volume do balão com água destilada fria, tampar e misturar por inversões (prova em branco).

- Transferir 50 mL do filtrado para um Erlenmeyer de 250 mL.
- Transferir 50 mL da prova em branco para outro Erlenmeyer de 250 mL.
- Adicionar 5 mL de nitrato de prata 0,1 mol/L S.V.
- Acrescentar 2 mL de solução de sulfato férrico amoniacal 34% (m/v) S.I.
- Titular por uma solução de tiocianato de potássio 0,1 mol/L S.V. até o ponto final detectável pelo aparecimento de coloração alaranjada.

Interpretação do resultado

- Calcular o teor de cloreto de sódio em % (m/m) por meio das fórmulas abaixo:

$$\% \text{ NaCl} = (B - A) \times fc,$$

segundo-se técnica descrita acima ou

$$\% \text{ NaCl} = \frac{(A - B) \times Ci \times fc \times 5,845}{g}$$

Sendo:

% NaCl: teor de cloreto de sódio em % (m/m);

A: volume de solução de tiocianato de potássio gasto na titulação da amostra;

B: volume de solução de tiocianato de potássio gasto na titulação da prova em branco;

Ci: concentração da solução tiocianato de potássio, em mol/L;

fc: fator de correção da solução de tiocianato de potássio;

g: massa da porção alíquota da amostra ($1,17/100 \times 50 = 0,5845$).

Adaptado (A.O.A.C.)

O procedimento aqui descrito encontra-se na referência (Pereira et al., 2001).

Soluções e reagentes

- Nitrato de prata 0,1 mol/L S.V.
- Tiocianato de potássio 0,1 mol/L S.V.

- Sulfato férrico amoniacal (sulfato de ferro III e amônio) 5–15% (m/v) S.I.
- Permanganato de potássio 7,5% (m/v) S.R.
- Ácido oxálico R. ou Glicose R.

Vidrarias

- Frasco Erlenmeyer, capacidade 500 mL.
- Pipeta graduada, capacidade 1 mL, intervalo de graduação de 0,01 mL.
- Pipeta graduada, capacidade 5 mL, intervalo de graduação de 0,5 mL.
- Pipeta graduada, capacidade 20 mL, intervalo de graduação de 0,5 mL.
- Bureta, capacidade 10 mL, intervalo de graduação de 0,05 mL.
- Frasco com água destilada.

Equipamentos e material necessário

- Balança analítica, capacidade 150 a 200 g, intervalo de medição de 0,1 mg.
- Capela de exaustão.
- Espátula de aço inox.
- Suporte para bureta.

Procedimento

- Pesar 1 g de amostra em um Erlenmeyer de 500 mL.
- Adicionar 12,5 mL de nitrato de prata 0,1 mol/L S.V. e 12,5 mL de ácido nítrico 6 mol/L S.R.
- Transferir 12,5 mL de nitrato de prata 0,1 mol/L S.V. e 12,5 mL de ácido nítrico 6 mol/L S.R. (prova em branco) para outro Erlenmeyer de 500 mL.
- Agitar e aquecer até ebulição em capela de exaustão.
- Acrescentar 5 mL de permanganato de potássio 7,5% (m/v) S.R.
- Manter a mistura sob fervura branda.
- Se houver descoloração, adicionar mais 5 mL de permanganato de potássio 7,5% (m/v) S.R. até a destruição total de matéria orgânica, que é observada pela permanência de coloração escura.

- Adicionar 0,5 g de ácido oxálico R. ou glicose R.
- Esfriar até a temperatura ambiente.
- Adicionar água destilada até o volume aproximado de 100 mL.
- Adicionar 1 mL de sulfato férrico amoniacal 5–15% (m/v) S. I.
- Titular por uma solução de tiocianato de potássio 0,1 mol/L até o ponto final detectável pelo aparecimento de coloração alaranjada.

Interpretação do resultado

Calcular o teor de cloreto de sódio em % (m/m) por meio da fórmula abaixo:

$$\% \text{ NaCl} = \frac{(B - A) \times C_i \times f_c \times 5,845}{g}$$

Sendo:

% NaCl: teor de cloreto de sódio em % (m/m);

A: volume de solução de tiocianato de potássio gasto na titulação da amostra;

B: volume de solução de tiocianato de potássio gasto na titulação da prova em branco;

C_i: concentração da solução tiocianato de potássio, em mol/L;

f_c: fator de correção da solução de tiocianato de potássio;

g: massa da amostra.

pH

Fundamento

O método eletroanalítico (potenciométrico) é uma aplicação da determinação de concentrações iônicas por meio de células eletroquímicas compostas por dois eletrodos: um de referência e outro de medição sensível ao íon a ser determinado. A diferença de potencial desenvolvida quando se insere o eletrodo indicador na solução em análise será proporcional à concentração em quantidade de matéria (mol/L) de íons H⁺ (H₃O⁺), podendo ser convertida diretamente em unidades de pH. O sistema deve ser previamente padronizado por meio de calibração com solução tampão de pH adequado e ajuste de temperatura.

O emprego do pH no controle de qualidade da indústria queijeira é fundamental, pois todas as etapas do processo requerem esse controle para verificação da fermentação e, ao final, para acompanhamento do processo de maturação.

Método eletroanalítico

O procedimento aqui descrito encontra-se na referência (Pereira et al., 2001).

Vidrarias

- Béquer, capacidade 100 mL.
- Funil de vidro.
- Erlenmeyer, capacidade 250 mL.

Material e equipamentos necessários

- Balança analítica, capacidade 150 a 200 g, intervalo de medição de 0,1 mg.
- Medidor de pH, calibrado com soluções-tampão entre pH 3 e 8.
- Frasco com água destilada em temperatura ambiente.
- Suporte para funil.
- Espátula em aço inox.
- Bastão de vidro.
- Algodão hidrófilo.
- Termômetro com escala de 0 a 100°C, intervalo de graduação de 1°C.

Procedimento

- Pesar aproximadamente 10 g de amostra em um béquer de 100 mL.
- Acrescentar aproximadamente 10 mL de água destilada.
- Misturar com bastão de vidro até formar uma pasta homogênea.
- Adicionar 30 mL de água destilada, misturar e deixar decantar por 5 min.
- Filtrar a mistura, através de algodão hidrófilo, para um Erlenmeyer de 250 mL.

- Enxaguar o algodão com aproximadamente 10 mL de água destilada.
- Esgotar o algodão com o bastão de vidro.
- Mergulhar o bulbo do eletrodo de medição (ou do eletrodo conjugado) na solução de análise.
- Acionar o botão de leitura de pH do aparelho.
- Fazer a leitura após estabilização.

Interpretação do resultado

Resultado direto em unidades de pH.

Resíduo mineral fixo (cinzas)

O procedimento aqui descrito encontra-se na referência Brasil (2017b).

Fundamento

Após a dessecação, a amostra é submetida à incineração (aproximadamente 550°C). Dessa forma, a fração orgânica da amostra volatiliza-se sob a forma de dióxido de carbono e água, permanecendo as cinzas no recipiente, que são uma estimativa do teor de minerais da amostra.

Embora esse método não seja empregado rotineiramente, muitas vezes torna-se necessário para se complementar a composição centesimal final dos queijos. Atenção deve ser dada ao controle de temperatura para evitar volatilização do cloreto de sódio, que ocorre acima de 600°C.

Material e equipamentos necessários

- Estufa regulada para 100–105°C.
- Mufla regulada para 500–550°C.
- Dessecador com sílica-gel ou cloreto de cálcio em escamas.
- Balança analítica, capacidade 150 a 200 g, intervalo de medição de 0,1 mg.
- Cadinho de porcelana.
- Pinça de metal para cadinho.

Procedimento

- Manter um cadinho de porcelana em forno de incineração (mufla) a 550°C por 30 min.
- Esfriar em dessecador e tarar (T).
- Pesar aproximadamente 5 g da amostra de queijo diretamente no cadinho de porcelana, com o auxílio de uma espátula, e anotar o resultado (Pi).
- Levar ao forno de incineração a 550°C até a completa carbonização (cinzas esbranquiçadas), o que ocorre em aproximadamente 3 horas.
- Desligar o forno de incineração e aguardar esfriamento até, aproximadamente, 200°C.
- Retirar o cadinho com auxílio de pinça metálica.
- Esfriar em dessecador e pesar, anotando o resultado (Pf).

Resultado

- Calcular o teor de resíduo mineral fixo (cinzas) por meio da fórmula abaixo:

$$\% \text{ RMF} = \frac{\text{Pf} - \text{T}}{\text{Pi} - \text{T}} \times 100$$

Sendo:

% RMF: teor de resíduo mineral fixo (cinzas), em % (m/m);

Pf: resultado da última pesagem;

Pi: resultado da pesagem inicial, após adição da amostra;

T: tara do cadinho de porcelana.

Capítulo 5

Análise para determinação de teor de cálcio livre em queijo

*Paulo Henrique Fonseca da Silva
João Pablo Fortes Pereira*

Extração por prensagem da fase aquosa do queijo

O procedimento aqui descrito encontra-se na referência (Salvat-Brunaud et al., 1995).

Fundamento

A prensagem hidráulica a frio permite a separação da fração aquosa do queijo juntamente com os componentes solúveis. O sistema de prensagem contendo um pistão acionado por unidade hidráulica com compressão gradativa permite a uniformidade composicional do extrato e previne alterações físico-químicas do queijo como o equilíbrio iônico dos minerais presentes na fase aquosa.

Material e equipamentos necessários

- Algodão hidrofóbico.
- Balança com capacidade de 5 kg.
- Bandeja plástica (medidas aproximadas: 450 mm x 280 mm x 150 mm “CxLxA”).
- Microesferas de vidro com diâmetro variando de 150 µm a 250 µm.
- Liquidificador.
- Tela sintética de porosidade 100 µm resistente à pressão.
- Prensa hidráulica.
- Frasco de vidro boca larga capacidade 500 mL.
- Funil de separação.

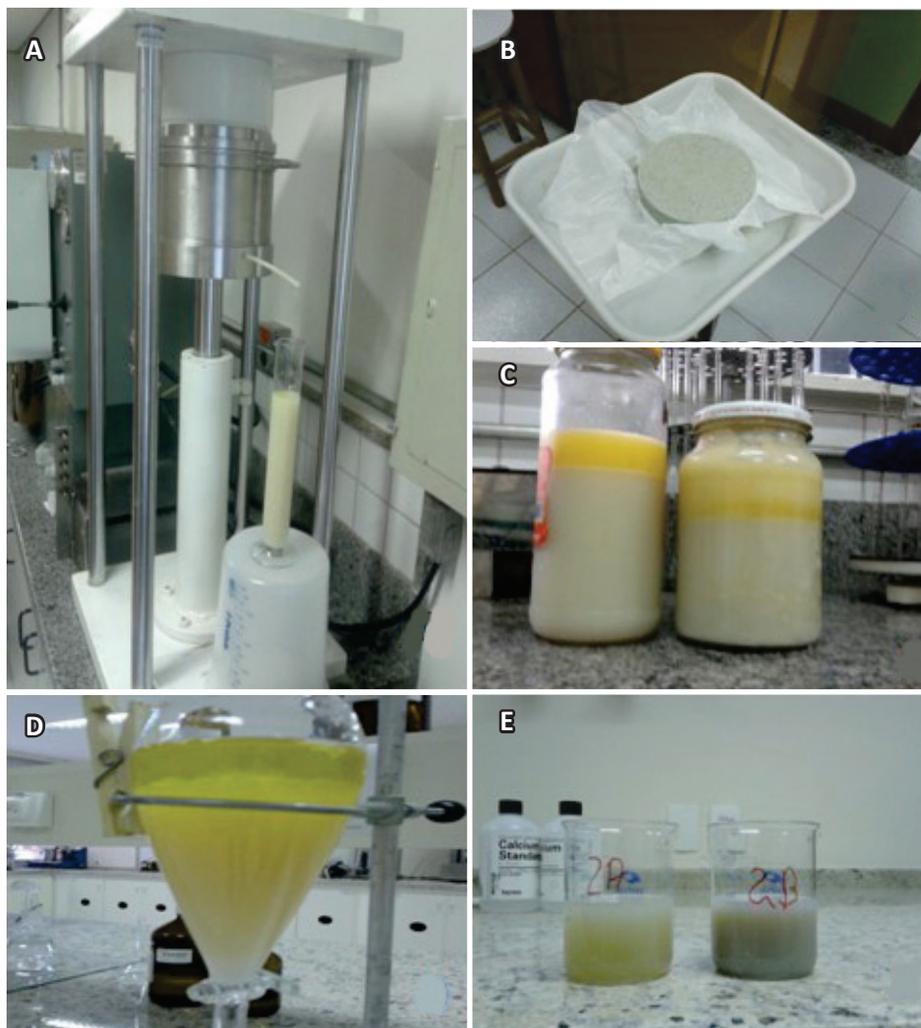
Procedimentos

- Triturar 1,8 kg de amostra em liquidificador e transferir para a bandeja plástica.
- Adicionar à bandeja 3,6 kg de microesferas de vidro.
- Misturar bem a amostra com a microesferas.
- Transferir a mistura para uma forma de aço inoxidável contida na prensa hidráulica previamente forrada pela tela sintética.
- Adaptar a forma contendo a mistura à prensa hidráulica.
- Acionar a prensa hidráulica com pressurizações crescentes sobre a mistura durante 180 min, conforme Tabela 1.
- Recolher a fase aquosa drenada pela prensa com o auxílio do frasco de vidro de boca larga.

Tabela 1. Pressão exercida sobre a amostra (bar ou MPa) em relação ao tempo de prensagem (minutos).

Tempo de Prensagem (min)	Pressão exercida		Tempo de Prensagem (min)	Pressão exercida	
	bar	MPa		bar	MPa
0–5	20	2	70–75	160	16
5–10	30	3	75–80	170	17
10–15	40	4	80–85	180	18
15–20	50	5	85–90	190	19
20–25	60	6	90–95	200	20
25–30	70	7	95–100	210	21
30–35	80	8	100–110	220	22
35–40	90	9	110–125	230	23
40–45	100	10	125–130	240	24
45–50	110	11	130–140	250	25
50–55	120	12	140–150	260	26
55–60	130	13	150–160	270	27
60–65	140	14	160–180	280	28
65–70	150	15	-	-	-

- Filtrar o extrato obtido pelo algodão hidrofóbico para retenção das partículas visíveis remanescentes.
- Separar a fase aquosa da fase lipídica com o auxílio de funil de separação.
- As etapas do procedimento são ilustradas na Figura 1.



Fotos: João Pablo Pereira

Figura 1. Etapas do procedimento para obtenção da fase aquosa do queijo minas padrão. (A) Prensa mecânica; (B) massa de queijo com microesfera após prensagem; (C) fase aquosa e lipídica resultante do processo de presagem do queijo; (D) separação da fase aquosa da fase lipídica; (E) fase aquosa separada.

Cálcio livre

O procedimento aqui descrito encontra-se na referência (Thermo Electron Corporation, 2012).

Fundamento

O cálcio livre é obtido por método eletroanalítico (potenciométrico). A determinação da contração de cálcio (Ca^{+2}) é realizada diretamente na amostra, sendo proporcional à diferença de potencial gerada entre os eletrodos de referência e o de medição, sendo este último sensível ao metal a ser determinado. O aparelho exige calibração prévia com soluções de concentração conhecidas preparadas a partir de solução padrão de cálcio.

Vidrarias

- Balões volumétricos, capacidades 25 mL e 50 mL.
- Bastão de vidro.
- Béquer, capacidade 100 mL.
- Micropipeta, capacidade 100 μL a 1000 μL .
- Pipeta volumétrica, capacidade 20 mL.
- Ponteira plástica capacidade 1000 μL .

Material e equipamentos necessários

- Potenciômetro Íon Seletivo (ISE) ThermoScientific – modelo Orion 4 Star para cálcio.
- Solução padrão de cálcio 0,1 mol/L.
- Solução de ajustador de força iônica (conforme fornecido pelo fabricante do equipamento).

Observação: antes do procedimento analítico, é necessária a ativação da membrana por meio de sua imersão em solução padrão de cálcio 10^{-2} mol/L por aproximadamente 48 horas.

Procedimento

- Preparar soluções padrões, com concentração 10 mg/L e 100 mg/L.
- Acrescentar às soluções preparadas 2% v/v de ajustador de força iônica.

- Proceder à calibração do eletrodo realizando-se a leitura, primeiramente da solução 10 mg/L e, na sequência, 100 mg/L.
- Transferir para um béquer 20 mL da amostra (fase aquosa do queijo obtida por meio do procedimento descrito no item 5.1).
- Acrescentar à amostra 2% v/v (400 μ L) de ajustador de força iônica.
- Lavar o eletrodo com água destilada ou deionizada.
- Secar o eletrodo com papel absorvente macio, sem esfregá-lo demasiadamente na superfície do eletrodo.
- Imergir o eletrodo e o sensor de temperatura na amostra.
- Acionar o botão de leitura do aparelho.
- Aguardar a estabilização do sinal analítico até a obtenção da sua leitura.
- Após a análise, lavar o eletrodo com água destilada ou deionizada e secar o eletrodo com papel absorvente macio, sem esfregá-lo demasiadamente na superfície do eletrodo.
- Manter o eletrodo imerso na solução padrão de cálcio 10^{-2} mol/L sempre que houver intervalo maior do que 1 minuto entre as leituras da amostra e no final das atividades.
- O medidor íon-seletivo para cálcio é mostrado na Figura 2.

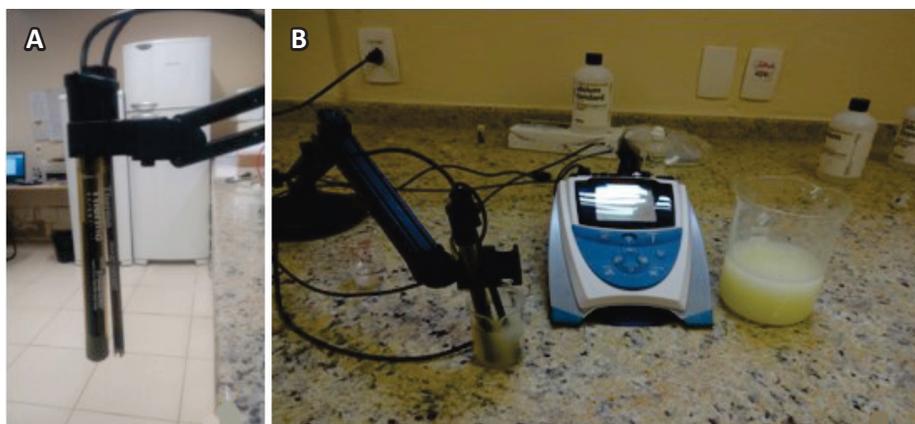


Figura 2. Medidor eletroquímico íons-seletivo para cálcio. (A) Destaque do eletrodo combinado e termocompressor; (B) potenciômetro Íon Seletivo (ISE) para determinação de cálcio livre.

Capítulo 6

Análises microbiológicas

*Jaqueline Flaviana Oliveira de Sá
Maria de Fatima Borges
Marta Fonseca Martins*

Para o queijo minas padrão, são exigidas pela legislação brasileira (Brasil, 1952; 1996; Agência Nacional de Vigilância Sanitária, 2001) as seguintes análises: coliformes totais e termotolerantes, *Staphylococcus* coagulase positivo e *Salmonella* sp. A seguir, estão descritas não só as análises exigidas pela nossa legislação, mas também a pesquisa de outros patógenos, como *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes* e *Escherichia coli* O157:H7, comumente envolvidos em surtos de toxinfecções alimentares no mundo.

Preparo das amostras

Antes de iniciar as análises, todas as amostras devem ser identificadas e a capela de segurança microbiológica deve ser preparada para a realização de todas as etapas das análises. A sanitização deve ser feita com algodão embebido em álcool 70% (v/v) e exposição à luz ultravioleta de 260 nm de comprimento de onda por 15 minutos. As embalagens devem ser sanitizadas com algodão embebido em álcool 70% (v/v) antes de serem abertas. A coleta das amostras deve ser realizada assepticamente com o auxílio de bisturis ou cilindros perfuradores estéreis e ser representativa do todo, ou seja, contemplar tanto a superfície como o interior do queijo. Todos os meios de cultura utilizados devem ser previamente preparados e esterilizados conforme recomendação do fabricante.

Coliformes totais e termotolerantes

O procedimento aqui descrito encontra-se na referência (Kornacki; Johnson, 2001; Davidson et al., 2004).

Indicação de uso

Essa metodologia deve ser utilizada quando o número esperado de coliformes na amostra for maior do que 100 unidades formadoras de colônias

(UFC)/g, o que normalmente ocorre em produtos muito manipulados como queijos.

Material e equipamentos necessários

- Tubos de ensaio.
- Tubos de Durhan.
- Pipetas graduadas.
- Placas de Petri.
- Homogeneizador tipo *stomacher*.
- Balança analítica.
- Estufa incubadora 36 + 1°C.
- Ágar violeta vermelho neutro bile (VRBA).
- Caldo verde brilhante bile 2% lactose (VBB).
- Solução salina peptonada 0,1%.
- Caldo *Escherichia coli* (EC).

Procedimentos

A. Pesagem e preparo da amostra

- Pesar assepticamente 25 ± 0,2 g da amostra.
- Adicionar 225 mL de solução salina peptonada 0,1%.
- Homogeneizar por aproximadamente 60 segundos em *stomacher*.
- Esta é a diluição 10⁻¹.

B. Coliformes totais ou a 30°C

- A partir da diluição inicial (10⁻¹), efetuar a próxima diluição passando 1 mL desta para um tubo com 9 mL de solução salina peptonada 0,1% e assim sucessivamente até a diluição desejada.
- Inocular 1 mL de cada diluição obtida em placas de Petri esterilizadas.
- Adicionar a cada placa aproximadamente 1,5 mL de ágar violeta vermelho neutro bile (VRBA) mantido a 46–48°C em banho-maria e previamente preparado conforme instruções do fabricante.
- Homogeneizar cuidadosamente e deixar em repouso até a total

solidificação do meio.

- Adicionar, sobre cada placa, cerca de 10 mL de VRBA, formando uma segunda camada de meio. Deixar solidificar.
- Após a completa solidificação do meio, incubar as placas em posição invertida em temperatura de $32 \pm 1^\circ\text{C}$ por 24 ± 2 h.
- Selecionar as placas que contenham entre 15 e 150 colônias para a leitura. Contar as colônias que apresentarem morfologia típica de coliformes, ou seja, colônias róseas, com 0,5 mm ou mais de diâmetro rodeadas por uma zona avermelhada de precipitação da bile presente no meio.
- Anotar os resultados de contagem.

Interpretação do resultado

Determinar o número de coliformes totais (UFC/g) multiplicando-se o número de colônias típicas pelo inverso da diluição.

C. Confirmação das colônias com aspecto duvidoso

A confirmação é recomendada quando as colônias apresentam aspecto duvidoso (comum em placas muito cheias) ou quando as placas foram inoculadas com amostras contendo quantidades significativas de outros carboidratos que não a lactose. Para a confirmação, transferir uma alçada de cada colônia suspeita para tubos contendo 10 mL de caldo verde brilhante bile 2% lactose (VBB) com tubo de Durhan e incubar a $35 \pm 1^\circ\text{C}$ por 24 a 48 h. Considerar como coliforme total (colônia confirmada) todos os tubos com crescimento (turvação do meio) e formação de gás (no mínimo 1/10 do volume total do tubo de Durhan) sem película superficial ou com efervescência quando agitado vagarosamente. Havendo gás e película superficial, submeter a cultura à coloração de Gram e a teste de oxidase, considerando-se como coliformes totais todas as culturas de bastonetes Gram-negativos e oxidase negativos.

D. Coliformes termotolerantes

- Repicar pelo menos 5 colônias típicas de coliformes totais crescidas no ágar violeta vermelho neutro bile (VRBA) para tubos contendo 10 mL de caldo *Escherichia coli* (EC) com tubo de Durhan (1 colônia para cada tubo).
- Incubar os tubos a $45 \pm 0,2^\circ\text{C}$ por 24–48 h em banho-maria com agitação.

- Leitura: a presença de coliformes termotolerantes é confirmada pelo crescimento (turvação do meio) e pela formação de gás (mínimo 1/10 do volume total do tubo de Durham) ou efervescência no tubo de caldo EC quando agitado vagarosamente.
- Anotar o resultado obtido para cada tubo.

Observação: a leitura pode ser feita após 24 h de incubação; porém, só serão válidos os resultados positivos. Os tubos que apresentarem resultado negativo em 24 h deverão ser incubados novamente por mais 24 h.

Interpretação do resultado

Expressar o resultado de coliformes termotolerantes em UFC/g segundo a fórmula descrita abaixo:

$$\text{UFC/g} = \frac{\text{Colônias Contadas} \times \text{Inverso da Diluição} \times \text{Colônias Confirmadas}}{\text{Colônias Isoladas}}$$

Onde:

Colônias contadas: na placa de ágar violeta vermelho neutro bile (VRBA) escolhida para a contagem de colônias.

Inverso da diluição: da placa de ágar VRBA escolhida para a contagem de colônias.

Colônias confirmadas: número de tubos de caldo *Escherichia coli* (EC) com crescimento (turvação do meio) e formação de gás.

Colônias isoladas: da placa de ágar VRBA para os tubos de Caldo EC.

Contagem de *Staphylococcus coagulase positivo* e *Staphylococcus aureus*

O procedimento aqui descrito encontra-se na referência (Lancette; Bennett, 2001; Henning et al., 2004).

Indicação de uso

Staphylococcus coagulase positivo são bactérias que produzem as enzimas coagulase, catalase e termonuclease. A produção de coagulase é muitas vezes associada à capacidade de produção de toxinas por algumas espécies do gênero *Staphylococcus*, sendo desta forma um indicador indireto do potencial

patogênico do microrganismo, o que justifica seu isolamento. Incluem-se nesse gênero as espécies *S. aureus*, *S. intermedius* e *S. hyicus*. A espécie *S. aureus* é a mais comumente envolvida em surtos de intoxicação alimentar, por isso o interesse na sua identificação, apesar da legislação de lácteos não a exigir (exige apenas a contagem do grupo *Staphylococcus* coagulase positivo).

Material e equipamentos necessários

- Diluente: água peptonada 0,1% esterilizada.
- Tubos de diluição contendo 9 mL de água peptonada 0,1% esterilizada.
- Pipetas de 1 mL ou 2 mL.
- Placas com ágar *Baird Parker* (BP).
- Estufa incubadora regulada a 35–37°C.
- Tubos com caldo infuso de cérebro e coração (BHI).
- Tubos com ágar de soja tripticaseína (TSA) inclinados.
- Coagulase plasma-EDTA.
- Placas ou lâminas com ágar azul de toluidina DNA.
- Peróxido de hidrogênio 3%.
- Tampão fosfato salina 0,02 M.
- Lisostafina.
- Tubos de caldo púrpura base com 0,5% de glicose.
- Tubos de caldo púrpura base com 0,5% de manitol.
- Óleo mineral estéril.
- Reagentes para coloração de Gram.
- Homogeneizador tipo *stomacher*.
- Homogeneizador tipo *vortex*.
- Balança analítica.
- Pipetas graduadas.
- Tubos de ensaio.
- Alça de platina.
- Alça de Drigalsky.

Procedimento

- Pesar 50 g de queijo (*Standard Methods for Examination of Dairy Products*) em saco plástico estéril e adicionar 450 mL de diluente (água peptonada 0,1% esterilizada). Homogeneizar a mistura (amostra/diluente) em homogeneizador tipo *stomacher* por 2 min. Esta é a diluição 10^{-1} . As demais diluições devem ser realizadas passando-se 1 mL da anterior para um tubo com 9 mL do mesmo diluente.
- A homogeneização das diluições subsequentes deverá ser realizada com o auxílio de agitador de tubos tipo *vortex*, por um período de tempo não superior a 1 minuto. Evitar a homogeneização manual das diluições, pois o processo manual resulta em maior variação da homogeneidade. Selecionar 3 diluições da amostra e inocular 0,1 mL de cada diluição na superfície de placas de ágar *Baird Parker* (BP) previamente preparadas.
- Espalhar o inóculo com uma alça de Drigalsky previamente flambada e resfriada ou esterilizada, começando das placas de maior diluição para as placas de menor diluição, até que todo o excesso de líquido seja absorvido.
- Se a contagem estimada de *S. aureus* for menor do que 100 UFC/g (amostra com baixo nível de contaminação), inocular 1 mL da primeira diluição, distribuindo o volume por quatro placas, três placas com 0,3 mL e uma com 0,1 mL.
- Aguardar até que as placas estejam secas (inóculo totalmente absorvido pelo ágar) e incubá-las invertidas a 35–37°C por 45–48 h.
- Selecionar para contagem as placas com 20 a 200 colônias; mais do que isso dificulta a contagem.
- Contar apenas as colônias típicas: circulares, pretas ou cinza-escuras, com 2 a 3 mm de diâmetro, lisas, convexas, com bordas perfeitas, rodeadas por uma zona opaca e/ou halo transparente se estendendo para além da zona opaca. Eventualmente colônias atípicas podem se apresentar cinzentas, sem um ou ambos os halos típicos. Se a placa apresentar colônias típicas e atípicas, deve-se contar cada tipo separadamente e anotar o resultado.
- Selecionar no mínimo 5 colônias típicas para o teste de coagulase; havendo menos do que cinco, utilizar todas. Se a placa apresentar colônias suspeitas de mais de um tipo, selecionar pelo menos duas de cada tipo.

- Com o auxílio de uma alça de platina previamente flambada e resfriada, transferir cada colônia para 5 mL de caldo infuso de cérebro e coração (BHI), emulsionando bem, e transferir uma alçada de cada tubo de caldo BHI para outro tubo contendo 10 mL de ágar de soja tripticaseína (TSA) inclinados.
- Incubar os tubos de caldo BHI e os de ágar a 35–37°C por 18 a 24 h. Reservar os tubos de ágar TSA para testes adicionais, caso seja necessário.

A. Teste da coagulase

- Transferir 0,2 mL de cada cultura em caldo BHI para tubos de ensaio esterilizados e acrescentar 0,5 mL de coagulase plasma EDTA.
- Incubar a 35–37°C por até 6 h e observar se há a formação de coágulo.
- A formação de um coágulo firme, que não se rompe quando o tubo é invertido, é considerada reação positiva de nível 4+. Um coágulo grande e organizado, formado na maior parte do tubo, é considerado de nível 3+. A formação de um pequeno coágulo organizado ou de pequenos coágulos desorganizados caracteriza reações positivas de 2+ ou 1+, respectivamente (Figura 1).

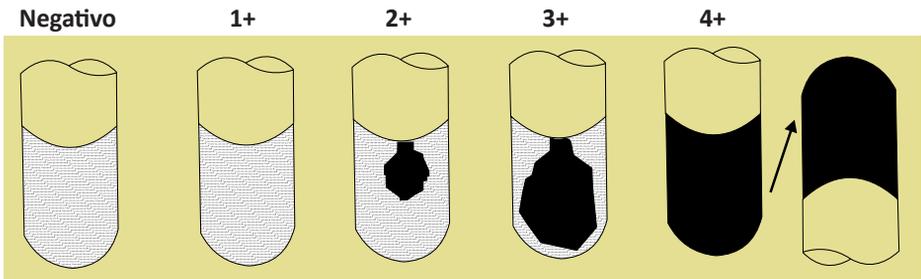


Figura 1. Teste da coagulase.

Fonte: BD BBL (2004).

Interpretação do resultado

Considerar como *Staphylococcus* coagulase positivo todas as culturas que formaram gel firme e organizado no teste de coagulase. Calcular o número de UFC/g em função do número de colônias típicas contadas, diluição inoculada e porcentagem de colônias confirmadas.

$$\text{UFC/g} = \frac{\text{Colônias Contadas} \times \text{Inverso da Diluição} \times \text{Colônias Confirmadas}}{\text{Colônias Isoladas}}$$

Onde:

Colônias contadas: na placa de ágar BP.

Inverso da diluição: da placa de ágar BP.

Colônias confirmadas: número de culturas que formaram gel firme e organizado no teste de coagulase.

Colônias isoladas: da placa de ágar BP para os tubos de caldo BHI.

B. Contagem de *Staphylococcus aureus*

As reações de níveis 4+ e 3+ são confirmativas da presença de *S. aureus*. As reações 1+ ou 2+ devem ser submetidas a testes adicionais (coloração de Gram, catalase, termonuclease e sensibilidade à lisostafina) para a confirmação.

C. Teste de catalase

A partir dos tubos de ágar TSA inclinados, emulsionar uma alçada da cultura em uma gota de peróxido de hidrogênio a 3% em uma lâmina de vidro. O borbulhamento imediato é teste positivo, e o não borbulhamento é teste negativo. *S. aureus* são catalase positivos.

D. Teste de termonuclease

A partir do caldo BHI, transferir uma porção da cultura para um tubo estéril e ferver em banho-maria por 15 minutos. Inocular a cultura fervida e resfriada nos orifícios previamente preparados em lâminas de ágar azul de toluidina DNA. Utilizar uma das perfurações para uma cepa padrão termonuclease positiva (*S. aureus* ATCC 12600) e outra para uma cepa padrão negativa (*S. epidermidis* ATCC 14990). Colocar as lâminas dentro de placas de Petri recobertas com papel de filtro umidificado e selar as placas com fita crepe. Incubar a 35–37°C/4 h ou 50°C/2 h e observar após a incubação se há formação de um halo róseo que se estende por cerca de 1 mm em redor das perfurações inoculadas (teste positivo), ou a ausência desse halo, indicativa de teste negativo. As cepas de *S. aureus* produzem termonuclease.

E. Teste de sensibilidade à lisostafina

A partir do Caldo BHI, transferir 0,1 mL da cultura para um tubo estéril com 0,1 mL de solução de lisostafina (dissolvida em tampão fosfato salina

0,02 M com 2% de NaCl na concentração de 25 µg/mL). Preparar um tubo com uma cepa padrão positiva (*S. aureus* ATCC 12600), outro tubo com uma cepa padrão negativa (*Kocuria varians* ATCC 15306) e um tubo “branco” com 0,1 mL da cultura suspeita e 0,1 mL de tampão fosfato salina 0,02 M com 2% de NaCl (sem lisostafina). Incubar os tubos a $37 \pm 1^\circ\text{C}$ por 2 h e observar se a suspensão perde a turbidez (teste positivo) ou permanece turva (teste negativo). *S. aureus* geralmente são lisadas pela lisostafina (sensíveis) e apresentam resultado positivo nesse teste.

F. Teste de utilização anaeróbica da glicose e do manitol

A partir dos tubos de TSA inclinados, emulsionar uma alçada da cultura em um tubo com caldo púrpura base com 0,5% de glicose e outra alçada para outro tubo com caldo púrpura base com 0,5% de manitol, previamente desaerados. Incluir um tubo com cepa padrão positiva (*K. varians* ATCC 15306) e um tubo “branco” não inoculado. Cobrir com uma camada de 2,5 mm de óleo mineral estéril e incubar por 5 dias a 37°C . Observar a ocorrência de viragem ácida para amarelo (teste positivo) ou não viragem (teste negativo). *S. aureus* utiliza a glicose e, usualmente, também o manitol anaerobicamente; *K. varians* não utiliza.

Interpretação do resultado

Considerar como *S. aureus* todas as culturas com reação de coagulase de níveis +3 e +4, e as culturas com reação de coagulase de níveis +1 e +2 desde que sejam Gram-positivas em forma de cocos em cachos e com características típicas apresentadas no Tabela 1.

Tabela 1. Características típicas de *S. aureus* em comparação com *S. epidermidis* e *Micrococcus* sp.

Características	<i>S.aureus</i>	<i>S. epidermidis</i>	<i>Micrococcus</i>
Catalase	+	+	+
Coagulase	+	-	-
Termonuclease	+	-	-
Lisostafina	Sensível	Sensível	Resistente
Utilização anaeróbica da glicose	+	+	-
Utilização anaeróbica do manitol	+	-	-

Fonte: Silva et al. (2010).

Calcular o número de UFC/g em função do número de colônias típicas contadas, da diluição inoculada e da percentagem de colônias confirmadas.

$$\text{UFC/g} = \frac{\text{Colônias Contadas} \times \text{Inverso da Diluição} \times \text{Colônias Confirmadas}}{\text{Colônias Isoladas}}$$

Onde:

Colônias contadas: na placa de ágar BP.

Inverso da diluição: da placa de ágar BP.

Colônias confirmadas: número de culturas isoladas que formaram géis de níveis +1 e +2, desde que sejam Gram-positivas em forma de cocos em cachos, catalase +, termonuclease +, sensíveis à lisostafina e utilizem a glicose e o manitol anaerobicamente.

Colônias isoladas: da placa de ágar BP para os tubos de caldo BHI.

Salmonella

O procedimento aqui descrito encontra-se na referência (Andrews et al., 2018).

Indicação de uso

A técnica convencional para detecção de *Salmonella* em alimentos é um método de cultivo clássico em que se avalia a presença/ausência do microrganismo. Esse método foi desenvolvido com a finalidade de garantir a detecção do patógeno mesmo em situações extremamente desfavoráveis (número reduzido de células do patógeno e número grande de microbiota competidora, células injuriadas por pH baixo ou alto teor de sal ou açúcar, congelamento, secagem, aplicação de calor, etc.).

Material e equipamentos necessários

- Caldo lactosado (CL).
- NaOH ou NaCl 1 N para ajuste de pH.
- Caldo *Rappaport-Vassiliadis* modificado (RV).
- Caldo tetrionato (TT).
- Caldo selenito cistina (SC).
- Ágar entérico de Hecktoen (HE).

- Ágar bismuto sulfito (BS).
- Ágar xilose lisina desoxicolato (XLD).
- Ágar tríplice açúcar ferro (TSI).
- Ágar lisina ferro (LIA).
- Solução salina formalinizada (Formalina).
- Antissoro flagelar polivalente anti-*Salmonella*.
- Antissoro Spicer-Edwards flagelar.
- Antissoro somático polivalente anti-*Salmonella*.
- Kits de identificação: API 20E ou Vitek GNI (*BioMérieux Vitek*) ou *Enterotube II* ou *Enterobacteriaceae II* (*Beckton Dickinson*) ou Remel™ Micro-ID™ (*Remel*).
- Banho-maria com circulação a $42 \pm 0,2^\circ\text{C}$.
- Banho-maria com circulação a $43 \pm 0,2^\circ\text{C}$.
- Estufa incubadora a $35 \pm 2^\circ\text{C}$.
- Estufa incubadora a $37 \pm 0,5^\circ\text{C}$.
- Banho-maria a $48\text{--}50^\circ\text{C}$.
- Homogeneizador tipo *stomacher*.
- Balança analítica.
- Pipetas graduadas.
- Tubos de ensaio.
- Alça de platina.
- Tubos de Durhan.

Procedimentos

A. Cultivo microbiológico

- Pré-enriquecimento: pesar 25 g de queijo em saco plástico estéril e adicionar 225 mL de caldo lactosado (CL).
- Deixar descansar 60 ± 5 minutos em temperatura ambiente.
- Homogeneizar, retirar uma alíquota de volume conhecido e verificar o

pH. Ajustar para pH 6,8 se necessário (com NaOH ou HCl 1 N), verificando o volume de caldo consumido e repondo com caldo lactosado estéril.

- Incubar a $35 \pm 2^\circ\text{C}$ por 24 ± 2 h com a tampa ligeiramente afrouxada.
- Enriquecimento seletivo: agitar cuidadosamente o frasco e transferir 0,1 mL do CL para 10 mL de caldo *Rappaport-Vassiliadis* Modificado e 1 mL para 10 mL de caldo TT, incubando-se o RV a $42 \pm 2^\circ\text{C}$ por 24 ± 2 h (em banho com circulação) e o TT a $35 \pm 2^\circ\text{C}$ por 24 ± 2 h (geralmente muito contaminado) ou $43 \pm 0,2^\circ\text{C}$ por 24 ± 2 h em banho com circulação (geralmente pouco contaminado).
- Plaqueamento diferencial: agitar os tubos de enriquecimento seletivo em *vortex* e estriar placas de ágar entérico de Hecktoen (HE), ágar bismuto sulfito (BS) e ágar xilose lisina desoxicolato (XLD). Incubar a $35 \pm 2^\circ\text{C}$ por 24 ± 2 h.

Interpretação dos resultados

- Ágar HE: as colônias típicas de *Salmonella* sp. apresentam coloração azul-esverdeada com ou sem centro negro.
- Ágar BS: as colônias típicas de *Salmonella* sp. apresentam coloração castanha, cinza ou preta com ou sem brilho metálico. O meio ao redor da colônia adquire coloração escura com o prolongamento da incubação. Algumas cepas produzem colônias verdes (atípicas).
- Ágar XLD: colônias típicas de *Salmonella* são rosa-escuro, com centro preto ou rosa-escuro e uma zona avermelhada levemente transparente ao redor. Cepas de *Salmonella* lactose positivas produzem colônias amarelas com ou sem centro preto.
- Confirmação preliminar das colônias: selecionar pelo menos duas colônias típicas de cada placa para confirmação preliminar. Na ausência de colônias típicas, selecionar as atípicas descritas acima. Com agulha de inoculação, inocular cada colônia (pouco inóculo) suspeita em um tubo contendo TSI inclinado, por estrias em profundidade. Com o mesmo inóculo, fazer estrias em LIA inclinado com duas picadas no fundo e estrias na rampa. Incubar a $35 \pm 2^\circ\text{C}/24 \pm 2$ h (ambos com as tampas afrouxadas para prevenir a produção excessiva de H_2S).
- Após esse período, observar se há a ocorrência de reação típica de *Salmonella* sp. Em ágar TSI, observa-se uma rampa alcalina (vermelha)

e fundo ácido (amarelo), com ou sem produção de H_2S (escurecimento). Em ágar LIA, o fundo e a rampa do tubo são alcalinos (roxo e sem alteração da cor do meio), com ou sem produção de H_2S (escurecimento). As culturas devem ser submetidas à confirmação definitiva obedecendo aos seguintes critérios (Tabela 2):

Tabela 2. Critérios a serem adotados para a confirmação definitiva de *Salmonella* sp.

Reação em LIA	Reação em TSI	Continuação
Rampa e fundo alcalinos com ou sem H_2S (típica)	Rampa alcalina e fundo ácido com ou sem H_2S (típica)	Continuar
Rampa e fundo alcalinos com ou sem H_2S (típica)	Rampa e fundo ácidos com ou sem H_2S (atípica)	Continuar
Rampa alcalina e fundo ácido, com ou sem H_2S (atípica)	Rampa alcalina e fundo ácido com ou sem H_2S (típica)	Continuar
Rampa alcalina e fundo ácido, com ou sem H_2S (atípica)	Rampa e fundo ácidos (atípica)	Descartar

Fonte: Silva et al. (2010).

Observações:

- Utilizar as culturas que apresentaram reação típica no ágar TSI na realização das provas sorológicas e bioquímicas de confirmação. Para os testes bioquímicos, utilizar um dos kits validados pela AOAC para *Enterobacteriaceae*: API 20E ou Vitek GNI (*BioMérieux Vitek*), *Enterotube II* ou *Enterobacteriaceae II* (*Beckton Dickinson*) ou Remel™ Micro-ID™ (*Remel*) e seguir as instruções dos fabricantes. Os testes sorológicos não devem ser substituídos por kits comerciais.
- As culturas que apresentarem resultado típico de *Salmonella* pela identificação do kit devem ser submetidas aos testes sorológicos flagelar e somático polivalentes.
- Descartar as culturas não identificadas como *Salmonella* pelo kit.

B. Testes sorológicos

Flagelar

- Transferir uma alçada da cultura em TSI para um tubo com 5 mL de caldo TSB e incubar a $35 \pm 2^\circ C$ por 24 ± 2 h.

- Adicionar 2,5 mL de formalina.
- Transferir para outro tubo 0,5 mL desta cultura formalinizada e 0,5 mL de antissoro flagelar polivalente contra *Salmonella*. Fazer junto o tubo controle negativo 0,5 mL desta cultura formalinizada e 0,5 mL de formalina.
- Incubar a 48–50°C por 1 h em banho-maria e observar de 15 em 15 min a ocorrência de aglutinação/floculação no tubo teste e ausência no tubo de controle negativo. Se os dois tubos flocularem, repetir o teste utilizando o antissoro *Spider-Edwards* (*Salmonella* apresenta resultado negativo para este teste).

Somático

- Emulsionar a cultura de 24 h em TSI em 2 mL de solução salina 0,85% estéril.
- Marcar 2 quadrados de 2 cm² em placa de Petri ou lâmina de vidro.
- Transferir 1 gota da cultura em salina para cada um dos quadrados.
- Adicionar uma gota do antissoro somático polivalente contra *Salmonella* em um dos quadrados e uma gota de solução salina 0,85% no outro e emulsionar bem.
- Observar contra um fundo preto bem iluminado se há aglutinação no quadrado com o antissoro.
- Verificar a qualidade do soro utilizado, fazendo-se um controle positivo com uma cepa padrão de *Salmonella*.

Observação: culturas com uma ou mais reações atípicas nos testes sorológicos devem ser submetidas aos testes adicionais: fermentação da lactose e da sacarose, vermelho de metila, *Voges-Proskauer* e citrato.

C. Testes bioquímicos

Teste da fermentação da lactose e sacarose

- Transferir uma alçada com inóculo leve da cultura crescida em TSI para um tubo contendo 10 mL de caldo vermelho de fenol ou caldo púrpura base suplementado com 1% de lactose (contendo tubinho de Durham).
- Incubar a 35 ± 2°C/48 ± 2 h com a tampa bem fechada e observar se ocorre viragem ácida do indicador, alterando a cor do meio para amarela,

com ou sem formação de gás dentro do tubinho de Durhan, o que indica teste positivo. Viragem alcalina (para rosa escuro no caldo vermelho de fenol ou caldo púrpura) ou não alteração da cor do meio, acompanhada da ausência de gás, indica teste negativo.

- Repetir o mesmo procedimento alterando o suplemento para 1% de sacarose.

Observações: considerar como negativas para *Salmonella* as culturas lactose positivas, exceto as malonato positivas (podem ser da subsp. *Arizonae*) ou as que apresentarem rampa ácida em TSI com reação típica em LIA. Considerar como negativas para *Salmonella* as culturas sacarose positivas, exceto as que apresentaram rampa ácida em TSI com reação típica em LIA.

Teste de vermelho de metila (VM) e Voges-Proskauer (VP)

- Transferir uma alçada com inóculo leve da cultura crescida em TSI para um tubo contendo 10 mL de Caldo VM-VP e incubar a 35°C por 48 h.
- Para o teste de VP, transferir assepticamente 1 mL da cultura para um tubo de ensaio, adicionar 0,6 mL de uma solução de α -naftol 5% e agitar.
- Adicionar em seguida 0,2 mL de uma solução de KOH 40%, agitar e adicionar alguns cristais de creatina para acelerar a reação.
- Deixar descansar em temperatura ambiente e fazer a leitura após 4 h. O desenvolvimento de uma cor rosa-escuro ou vermelho-rubi no meio de cultura indica teste positivo. A permanência do meio na cor inicial do reagente (amarelada ou ligeiramente esverdeada) indica teste negativo.
- Reincubar a cultura remanescente (a que sobrou no tubo com Caldo VM-VP) por mais 48 h adicionais e realizar o teste VM com 96 h de incubação.
- Para a realização do teste, adicionar, a cada 5 mL de cultura, 5 a 6 gotas da solução de vermelho de metila e observar imediatamente se o meio adquire uma coloração vermelha (teste positivo) ou amarela (teste negativo). *Salmonella* é VP (-) e VM (+).

Teste de citrato

- Com uma agulha de inoculação, transferir uma alçada com inóculo leve da cultura crescida em TSI para um tubo contendo ágar citrato de Simmons inclinado, picando o fundo e estriando a rampa.

- Incubar a 35°C por 96 h e observar se há viragem alcalina da cor do indicador, alterando o meio de verde para azul (teste positivo). A cor do meio inalterado indica teste negativo. A maioria das cepas de *Salmonella* é citrato positivo.

Interpretação do resultado

Considera-se *Salmonella* sp. culturas identificadas pelo *kit* miniaturizado de identificação, validado pela AOAC e que apresentaram resultados positivos nos testes sorológicos somático e flagelar.

O resultado é expresso como presença ou ausência de *Salmonella* em 25 g de amostra.

Listeria monocytogenes

O procedimento aqui descrito encontra-se na referência (Hitchins; Jinneman; Chen, 2017).

Indicação de uso

Os métodos de detecção de *L. monocytogenes* em alimentos utilizam como características seletivas de isolamento principalmente sua resistência a vários antibióticos. É importante ressaltar que o crescimento de *L. monocytogenes* em alimentos não é uniforme, e em queijos deve-se coletar a unidade analítica em regiões mais próximas da superfície.

Material e equipamentos necessários

- Tubos de ensaio.
- Pipetas graduadas.
- Homogeneizador tipo *stomacher*.
- Balança analítica.
- Estufa incubadora a 30°C.
- Caldo de enriquecimento pra *Listeria* tamponado (BLEB).
- Solução de acriflavina 0,5%.
- Solução de cicloeximida 1%.
- Solução de ácido nalidíxico 0,5%.
- Placas de ágar Oxford (OXA).

- Tubos de ágar tripticaseína de soja extrato de levedura (TSA-YE).
- Tubos de ágar sulfeto indol motilidade (SIM).
- Peróxido de hidrogênio a 3%.
- Reagentes para a coloração de Gram.
- Kit comercial de identificação, como API *Listeria* (BioMérieux) ou Remel™ Micro-ID™ (Remel) ou MicroArray for *Listeria* (Biolog) ou o Vitek *Automicrobial Gram Positive and Gram Negative Identification Cards* (BioMérieux).

Procedimento

- Pré-enriquecimento e enriquecimento seletivo: homogeneizar 25 g da amostra com 225 mL de BLEB, contendo piruvato de sódio, mas sem os agentes seletivos. Incubar a 30°C por 4 h.
- Adicionar os agentes seletivos (0,445 mL de solução de acriflavina 0,5%; 1,8 mL de solução de ácido nalidíxico 0,5% e 1,15 mL de solução de cicloeximida 1%). Reincubar a 30°C até completar 48 h.
- Plaqueamento seletivo e diferencial: agitar cuidadosamente o frasco de BLEB e estriar uma alçada da cultura em uma placa de OXA. Incubar a 35°C e observar a presença de colônias típicas com 24 h de incubação: colônias esféricas, pretas, rodeadas por um halo preto de hidrólise da esculina. Se não houver colônias típicas neste intervalo, reincubar até completar 48 h.
- Confirmação de colônias típicas: selecionar pelo menos 5 colônias típicas de cada placa para a confirmação e estriar cada colônia em uma placa de ágar TSA com 0,6% de extrato de levedura (TSA-YE) para a purificação.
- Incubar a 30°C por 24–48 h e observar as colônias utilizando-se uma fonte forte de luz branca na parte inferior das placas, posicionadas em ângulo de 45° em relação à fonte de luz. Selecionar uma colônia azulada típica, bem isolada, para a realização das provas de confirmação.
- Com uma alça de platina, transferir a colônia para um tubo de TSA-YE inclinado e um tubo de caldo TSB-YE.
- Incubar a 30°C por 24 h. Usar essas culturas em ágar TSA-YE ou em caldo TSB-YE para a realização das provas bioquímicas.

A. Testes bioquímicos

Teste de catalase

A partir dos tubos de TSA-YE, transferir uma alçada da cultura para uma lâmina de microscopia, cobrir com uma gota de peróxido de hidrogênio 3% e observar a ocorrência de borbulhamento imediato (teste positivo) ou não borbulhamento (teste negativo). As cepas de *Listeria* são catalase positivas.

Coloração de Gram

A partir dos tubos de TSA-YE, fazer um esfregaço e submeter à coloração de Gram. Todas as espécies de *Listeria* são bastonetes curtos Gram-positivos.

Teste de motilidade

A partir dos tubos de TSB-YE, inocular cada cultura suspeita em tubos de ágar SIM, por picada no centro do meio de cultura, até uma distância a 1 cm do fundo. Incubar a 25°C por 7 dias, observando diariamente. As cepas de *Listeria* são móveis e desenvolvem uma zona de migração típica, espalhando-se na parte superior do meio e mantendo-se restritas à picada no fundo do tubo, produzindo uma massa de crescimento que lembra um guarda-chuva. Sempre comparar com uma cepa padrão de *L. monocytogenes*.

Culturas com características típicas de *Listeria* nestes testes podem ser confirmadas utilizando-se um sistema comercial como o API *Listeria* (BioMérieux) Remel™ Micro-ID™ (*Remel*) ou MicroArray for *Listeria* (Biolog) ou o *Vitek Automicrobic Gram Positive and Gram Negative Identification Cards* (BioMérieux).

Tabela 3. Resultado típico de *L. monocytogenes* nas provas bioquímicas.

Provas bioquímicas	<i>L. monocytogenes</i>
Catalase	+
Gram	+
Motilidade	+
Hemólise	+
Fermentação da dextrose	+
Fermentação da xilose	-
Fermentação da raminose	+
Fermentação do manitol	-
Fermentação da maltose	+
Hidrólise da esculina	+

Interpretação do resultado

Considera-se *L. monocytogenes* culturas identificadas pelo *kit* de identificação validado pela AOAC. O resultado é dado como presença ou ausência de *L. monocytogenes*/25 g.

***Escherichia coli* O157:H7**

O procedimento aqui descrito encontra-se na referência (Feng et al., 2018).

Indicação de uso

A detecção de *E. coli* O157:H7 baseia-se nas principais características que diferenciam esse sorotipo das demais cepas de *E. coli*, como a incapacidade de fermentar o sorbitol e de produzir a enzima β -glucuronidase.

Material e equipamentos necessários

- Tubos de ensaio.
- Pipetas graduadas.
- Homogeneizador tipo *stomacher*.
- Balança analítica.
- Caldo de enriquecimento para *E. coli* enterohemorrágica (EHEC-EB).
- Placas de ágar MacConkey sorbitol telurito cefixima (TC-SMAC).
- Tubos de ágar de soja tripticaseína extrato de levedura (TSA-YE).
- Placas de ágar Levine eosina azul de metileno (L-EMB).
- Reagente de Kovac's para teste de indol.
- Discos de *Coli Complete*.
- Antissoro somático O157 ou *kits* de aglutinação em látex.
- Antissoro flagelar H7 ou *kits* de aglutinação em látex.
- *Kit* API 20E (BioMérieux).
- Shaker incubador a $37 \pm 0,5^\circ\text{C}$ com agitação.
- Estufa incubadora $36 \pm 1^\circ\text{C}$.

Procedimento

- Enriquecimento: homogeneizar 25 g da amostra com 225 mL de caldo EHEC-EB. Incubar a $37 \pm 0,5^\circ\text{C}/24$ h com agitação.

- Plaqueamento seletivo diferencial: agitar delicadamente os frascos de caldo EHEC-EB e estriar uma alçada de cada cultura (estrias de esgotamento) em uma placa de ágar TC-SMAC. Em outra placa de ágar TC-SMAC, plaquear por superfície 0,1 mL da cultura em EHEC-EB. Incubar a $36 \pm 1^\circ\text{C}$ / 18 a 24 h.
- Confirmação preliminar: selecionar cinco colônias típicas no ágar TC-SMAC (incolores ou acinzentadas, com centro esfumado e 1–2 mm de diâmetro). Estriar cada colônia em uma placa de ágar TSA-YE. Incubar a $36^\circ\text{C}/18$ a 24 h.
- Selecionar as colônias bem isoladas para os testes de indol, crescimento em L-EMB e produção de β -glucuronidase.

Teste do indol

- Colocar uma folha de papel de filtro em uma placa de Petri e umedecer com o reagente de Kovac's para teste de indol.
- Com uma alça de inoculação, remover uma pequena quantidade da cultura e espalhar sobre o reagente no papel, observando se ocorre o desenvolvimento de uma cor vermelho violeta (teste positivo) ou não (teste negativo). *E. coli* O157:H7 é indol positiva. Todas as culturas indol negativas podem ser descartadas.

Teste de crescimento em L-EMB e produção de β -glucuronidase

- A partir de cada cultura indol positiva em TSA-YE, estriar uma alçada em ágar L-EMB e uma alçada em uma nova placa de TSA-YE.
- No primeiro quadrante das estrias em TSA-YE (parte mais carregada de inóculo), colocar um disco de *Coli Complete* (BioControl Systems, Inc), que contém MUG (4-metilumbeliferil- β -D-glucuronídeo), substrato para a enzima β -glucuronidase.
- Preparar uma placa TSA-YE da mesma forma, usando uma cultura padrão de *E. coli* glucuronidase positiva (controle positivo).
- Incubar todas as placas por uma noite a $35\text{--}37^\circ\text{C}$ e observar se as culturas apresentam características típicas no par de placas. Em L-EMB *E. coli* O157:H7 apresenta colônias com centro preto, com ou sem brilho metálico. Na placa de TSA-YE com o disco de *Coli Complete*, observada sob luz ultravioleta (ondas longas, 365 nm), *E. coli* O157:H7 não apresenta

fluorescência azulada em redor do disco (β -glucuronidase negativa), enquanto a cepa padrão de *E. coli* é positiva.

- Descartar as culturas β -glucuronidase positivas.

Confirmação definitiva

Para a confirmação definitiva, são realizados os seguintes testes: teste sorológico O157, teste sorológico flagelar H7 e testes bioquímicos do *kit* API 20E (BioMérieux).

A. Teste sorológico somático O157

A confirmação do grupo O157 é feita pelo teste padrão de aglutinação em lâmina.

- Emulsionar a cultura de 24 h em TSA-YE em 2 mL de solução salina 0,85% estéril.
- Marcar 2 quadrados de 2 cm² em placa de Petri ou lâmina de vidro.
- Transferir 1 gota da cultura em salina para cada um dos quadrados.
- Adicionar uma gota do antissoro somático polivalente contra O157 em um dos quadrados e uma gota de solução salina 0,85% no outro e emulsionar bem.
- Observar contra um fundo preto bem iluminado se há aglutinação no quadrado com o antissoro.
- Verificar a qualidade do soro utilizado fazendo um controle positivo com uma cepa padrão de *E. coli* O157:H7.

B. Teste sorológico flagelar H7

Apenas as culturas positivas no teste sorológico somático O157 devem ser submetidas ao sorológico flagelar. O procedimento mais comum é a utilização de *kits* de aglutinação em látex, cujo princípio é o mesmo do O157, substituindo-se o antissoro. Para a realização do teste, devem ser seguidas as orientações do fabricante.

C. Confirmação bioquímica com o *kit* API 20E

O teste deve ser feito seguindo-se as orientações do fabricante. A combinação mais típica de *E. coli* O157:H7 nos 21 primeiros testes da cartela de resultados é “5144172” (91,0% das cepas), podendo também

ocorrer as combinações “5144152” (cepas sacarose negativas) e “5144162” (cepas raminose negativas).

D. Presença dos genes das Shiga toxinas stx1 e stx2

Deve ser realizado caso haja necessidade de detecção.

Enviar a um laboratório especializado para a realização de testes moleculares com sondas genéticas ou PCR (reação em cadeia da polimerase). Para uma triagem inicial, pode ser utilizado o *kit* de aglutinação passiva reversa em látex (RPLA) da Oxoid ou similar, seguindo-se as orientações do fabricante. Esse *kit* detecta a produção das toxinas.

Interpretação do resultado

Considera-se *E. coli* O157:H7 culturas identificadas pelo *kit* de identificação API 20E validado pela AOAC. O resultado é dado como presença ou ausência de *E. coli* O157:H7/25 g.

Capítulo 7

Detecção de patógenos por PCR em tempo real

Juliana França Monteiro de Mendonça

Jaqueline Flaviana Oliveira de Sá

Maria de Fatima Borges

Marta Fonseca Martins

Existem várias metodologias disponíveis para identificação de microrganismos em alimentos. As técnicas de microbiologia clássica, apesar de serem consideradas “padrão ouro”, são laboriosas e demandam um tempo relativamente longo para se chegar a um diagnóstico definitivo (Dwivedi; Jaykus, 2011; Elizaquível et al., 2014).

Dessa forma, o uso de técnicas moleculares para identificação de agentes patogênicos em alimentos tem sido cada vez mais frequente. Isso se deve, principalmente, ao fato de essas técnicas serem altamente sensíveis e específicas, além do menor tempo demandado para se obter um resultado definitivo. Além disso, destaca-se a possibilidade de detecção de mais de um microrganismo-alvo em uma mesma reação, as chamadas reações *multiplex*, o que agiliza ainda mais o diagnóstico. Entretanto, apesar de todas essas vantagens, as técnicas moleculares apresentam algumas limitações, como a incapacidade de diferenciar células viáveis e inviáveis de microrganismos, permitindo a ocorrência de resultados falso-positivos.

Dentre as técnicas moleculares disponíveis, destaca-se a reação em cadeia da polimerase em tempo real (qPCR), que possibilita a amplificação de sequências de DNA específicas do genoma de qualquer organismo, mesmo quando em misturas complexas, como é o caso do queijo minas padrão. Permite, ainda, como o próprio nome indica, a verificação do resultado em tempo real, eliminando etapas posteriores de manipulação das amostras e diminuindo ainda mais o tempo necessário para um resultado definitivo.

Para que a técnica de qPCR seja realizada, é necessário que a amostra passe por algumas etapas anteriores, como a extração e quantificação do

DNA para que, então, as placas sejam montadas e as amostras analisadas para pesquisa dos microrganismos-alvo.

Extração de DNA

Fundamento

Vários métodos podem ser utilizados para extração de DNA de microrganismos patogênicos, desde protocolos *in house* ou domésticos até o uso de *kits* comerciais específicos. Independentemente do método utilizado, o princípio da técnica é o mesmo e inclui as seguintes etapas: rompimento da parede celular e/ou membranas, extração do DNA em solução, purificação e precipitação do DNA e ressuspensão deste em água ultrapura ou soluções-tampão adequadas. É muito importante que a qualidade e a integridade do DNA extraído sejam preservadas para o sucesso na realização em etapas posteriores, como a PCR em tempo real.

O rompimento da parede celular e/ou membranas pode ser realizado por meio de processos mecânicos e/ou enzimáticos, tanto nos métodos domésticos quanto em *kits*. Esse passo baseia-se no uso de enzimas (lisozima, lisostafina ou proteinase K) e soluções detergentes que solubilizam as membranas celulares e expõem o material genético dos patógenos.

A solução de fenol-clorofórmio é bastante utilizada em métodos domésticos para a purificação do DNA. Essa solução causa a desnaturação das proteínas presentes na amostra, separando-as do DNA. Já para a precipitação do DNA, é necessário utilizar álcool absoluto e uma solução de sal catiônico. Por fim, o DNA extraído e purificado deve ser ressuspensionado em água ultrapura ou em solução-tampão para a posterior quantificação.

Alguns *kits* comerciais utilizam tampões de lise, colunas de extração e tampões de lavagem para a extração e purificação do DNA. Os tampões de lise geralmente são compostos por um agente quelante que fará a quelação de Mg^{2+} e Ca^{2+} (cofatores de DNase), um detergente para o rompimento das membranas, uma enzima para o rompimento da parede celular, um sal para estabilização das cargas e um tampão para manutenção do pH ideal da reação. O DNA é, então, precipitado com etanol e aplicado nas colunas, que, por diferenças de cargas, possuem membranas de afinidade com o DNA. Assim, o DNA pode passar por algumas etapas de lavagens para ser purificado e,

posteriormente, eluído em água ou em uma solução-tampão. Entretanto, cada *kit* possui reagentes e especificações próprios e, no caso de serem utilizados para a extração do DNA, as recomendações do fabricante devem ser seguidas.

Assim, para cada tipo de matriz (queijo, iogurte, leite, etc.) deve ser testada a melhor metodologia para extração de DNA. Logo após, deve ser feita a quantificação do DNA da amostra em espectrofotômetro para a montagem da placa e realização da PCR em tempo real.

Quantificação do DNA

Fundamento

A quantificação de DNA por espectrofotometria ocorre de acordo com a lei de Lambert-Beer, que estabelece uma relação linear entre a concentração molecular do soluto que nela se encontra e a absorbância. São realizadas leituras a 260 nm, comprimento de onda no qual ocorre o pico de absorbância máxima de luz do DNA puro. Assim, a leitura da absorbância a 260 nm permite o cálculo da concentração dos ácidos nucleicos presentes na amostra.

A pureza do DNA extraído pode ser avaliada de acordo com as razões A260/A280 e A260/A230. A razão A260/A280 deve ser em torno de 1,8 e valores abaixo desse indicam contaminação da amostra por proteínas. Nesses casos, a amostra pode ser purificada repetindo-se a etapa da digestão com proteinase K, por exemplo, para eliminação dessas proteínas. A razão A260/A230, por sua vez, deve ser em torno de 2,0. Valores abaixo desse indicam contaminação da amostra por sais, que podem afetar as reações enzimáticas da PCR. Nesses casos, a amostra pode ser repurificada por uma nova precipitação por etanol.

Material e equipamentos necessários

- NanoDrop™ 1000.
- Micropipetas de 1 µL.
- Ponteiros para pipetas de 1 µL.
- Água ultrapura.
- Papel absorvente.
- Solução utilizada para ressuspensão do DNA (para calibração do equipamento).

Procedimentos

- Abrir o *software* no módulo de interesse (ácido nucleico) e seguir a checagem inicial do fabricante.
- Levantar o braço do equipamento e pipetar de 1 a 2 μL de água ultrapura na região onde passa o feixe de luz.
- Abaixar o braço do equipamento e inicializar o espectrofotômetro clicando em “Measure”.
- Levantar o braço do equipamento e limpar a região de leitura com papel absorvente suave que não deixe resíduos de fibras.
- Pipetar de 1 a 2 μL da solução branco na região de leitura usando o tampão/solução em que a amostra está ressuspensa.
- Abaixar o braço do equipamento e clicar em “Blank”.
- Levantar o braço do equipamento e limpar a região de leitura para fazer a leitura das amostras.
- Pipetar 1 a 2 μL da amostra a ser quantificada e abaixar o braço do equipamento.
- Entrar com o nome ou código da amostra e clicar em “Measure”.

Resultado

O resultado da quantificação do DNA aparecerá como:

$$\frac{\text{ng DNA}}{\mu\text{L amostra}}$$

A partir da quantificação, o DNA é diluído em água ultrapura para que a PCR possa ser realizada com concentração específica de DNA.

PCR em tempo real

Fundamento

A técnica de PCR em tempo real (qPCR) baseia-se na amplificação do gene-alvo, em cada ciclo da reação, associada à captação contínua de sinais de fluorescência emitidos pelos fluoróforos adicionados. Durante a fase exponencial de amplificação, é possível determinar um valor de intensidade

de fluorescência na qual todas as amostras podem ser comparadas. Este valor é denominado Limiar (*threshold*) e é calculado em função da quantidade de fluorescência basal (*background*). Neste ponto, o sinal de fluorescência gerado por cada amostra é significativamente maior do que a fluorescência basal. Deve-se ressaltar que a quantidade de produto gênico amplificado é diretamente proporcional à quantidade de fluorescência emitida pelos fluoróforos e captada pelo equipamento em cada ciclo da reação. A quantidade de ciclos de PCR requeridos para que cada amostra emita fluorescência suficiente para alcançar este ponto é definida como ciclo limiar (*cycle threshold*) ou Ct. O Ct é específico para cada amostra e é inversamente proporcional à quantidade inicial do alvo presente na reação.

Os principais fluoróforos utilizados na qPCR são classificados como intercalantes de DNA (*SYBR® Green*) e sondas de hidrólise (TaqMan™). O *SYBR® Green* é uma molécula que se intercala de maneira inespecífica a moléculas de DNA dupla fita, emitindo fluorescência quando ligado. Dessa forma, o sinal de fluorescência emitido por esse intercalante é proporcional à quantidade de moléculas de DNA dupla fita a que ele está ligado. Dentre as vantagens do uso do *SYBR® Green*, destaca-se o custo relativamente baixo dos testes em que é utilizado, uma vez que seu custo é mais baixo em relação aos outros tipos de fluoróforos. Entretanto, devido à sua inespecificidade de ligação, ou seja, liga-se de maneira inespecífica a moléculas de DNA dupla fita, algumas desvantagens de seu uso podem ser enumeradas, como a ocorrência de reações falsa-positivas e a impossibilidade de ser usado em reações multiplex.

O sistema TaqMan™, por sua vez, constitui-se em oligonucleotídeos marcados com fluoróforos (sondas) que se anelam em regiões específicas do alvo, entre as regiões de anelamento dos *primers*. Devido a essa característica, os ensaios TaqMan™ são altamente específicos e permitem, portanto, a realização de reações multiplex, uma vez que cada alvo da reação terá seu sinal de fluorescência captado de forma distinta pelo equipamento. Porém, essa mesma característica confere aos ensaios um custo mais elevado, se comparado aos ensaios com *SYBR® Green*.

Apesar dos métodos moleculares possuírem vantagens sobre os métodos tradicionais, principalmente em relação à especificidade, à sensibilidade e ao tempo demandado para um resultado definitivo, algumas limitações precisam ser consideradas. Em amostras de alimentos, é importante que a técnica utilizada seja capaz de diferenciar células viáveis e inviáveis de patógenos

potencialmente presentes. As técnicas moleculares mostram-se incapazes de realizar tal diferenciação, uma vez que a molécula de DNA permanece intacta mesmo após a morte do patógeno. Além disso, é importante destacar que em todos os ensaios devem ser incluídos controles positivos e negativos. Controles negativos e positivos são importantes para eliminar ou diminuir a ocorrência de resultados falso-negativos ou positivos. As causas para as ocorrências são erros técnicos, contaminantes e condições de reação não padronizadas. É comum os testes, cuja matriz seja alimentos, incluírem um controle positivo interno para verificar a presença de inibidores da PCR nas amostras de DNA. O IPC é um fragmento de DNA conhecido que necessita de *primers* diferentes do que se deseja testar para a sua amplificação.

Preparo das reações

Antes de iniciar o preparo das reações, deve-se:

- Identificar em um mapa ou uma planilha a amostra correspondente a cada poço da placa.
- Deve ser feita, no mínimo, uma duplicata para cada amostra.
- Retirar o DNA do *freezer* e colocá-lo distante do lugar em que será montada a reação.
- Retirar do *freezer* os reagentes e colocá-los em gelo para descongelar.

Material e equipamentos necessários

- Micropipetas de 1000 μ L, 200 μ L e 20 μ L.
- Ponteiras para micropipetas.
- Placas óticas com 96 poços.
- Filme adesivo óptico.
- Equipamento PCR em tempo real.
- *TaqMan Universal PCR Master Mix (2X)*.
- *Primers* para o microrganismo-alvo.
- Sondas para o microrganismo-alvo.
- Amostras de DNA.

Procedimentos

Adicionar todos os itens do *mix* da reação em um microtubo com volume suficiente, conforme Tabela 1, sonda e *primers* na concentração adequada para cada alvo.

Tabela 1. Exemplo de condições da reação.

Estoque	[Final]	1 RX
Master Mix 2X	1X	12,5 µL
Primer F (10 µM)	100 nM	0,25 µL
Primer R (10 µM)	100 nM	0,25 µL
Sonda (10 µM)	300 nM	0,75 µL
DNA	50 ng	-
Água	-	-
Volume Total		25,0 µL

- Adicionar água ultrapura ao *mix* para alcançar o volume final de cada reação (25 µL).
- Adicionar o volume de mix necessário para cada reação nos poços da placa de PCR em tempo real, conforme o mapa montado previamente.
- Adicionar, em cada poço, a quantidade de DNA indicada para cada reação.
- Adicionar água ultrapura ao poço do controle negativo.
- Cobrir a placa com o filme óptico adesivo.
- Centrifugar a placa a 1000 x g por 1 min a 4°C. Importante: usar um contrapeso nessa etapa. Para isso, deve-se pesar a placa montada e usar outra com peso idêntico para não desbalancear a centrífuga.
- Colocar a placa no equipamento de PCR em tempo real (ex.: *7300 Real Time PCR System*).
- Configurar o programa desejado (Tabela 2).

Tabela 4. Exemplo de condições de termociclagem da PCR em tempo real.

	40 ciclos
95°C – 10 min	95°C – 0,5 min
	60°C – 1 min

Resultado

Os resultados da qPCR são obtidos em valores de *Cycle Threshold* (C_t), que indicam o ciclo em que o sinal de amplificação exponencial atinge uma intensidade de fluorescência superior ao limiar de detecção (*Threshold*). Amostras que ultrapassam o *Threshold* são consideradas positivas, conforme exemplificado na Figura 1.

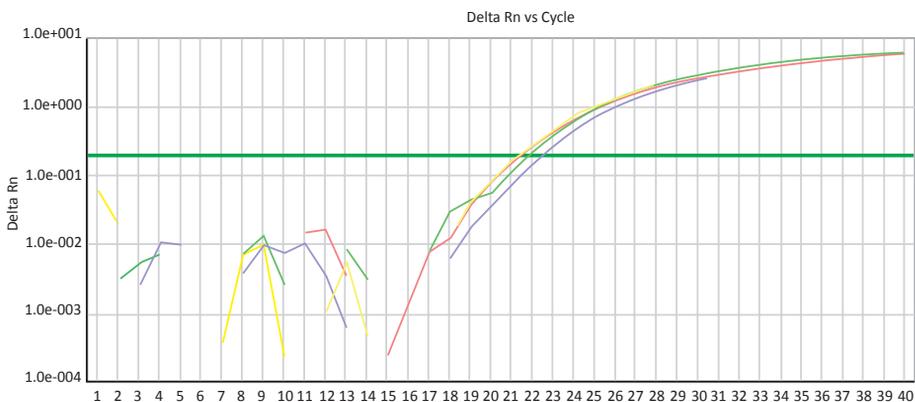


Figura 1. Exemplo de perfil de amplificação de reação *monoplex* de PCR em tempo real para *Listeria monocytogenes* ATCC 19117. A linha verde representa o *Threshold*.

Fonte: Sá (2012).

Referências

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Resolução RDC nº 12, de 2 de janeiro de 2001. Dispõe sobre o Regulamento Técnico sobre Padrões Microbiológicos para Alimentos. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 2 de janeiro de 2001. Disponível em: http://portal.anvisa.gov.br/documents/33880/2568070/RDC_12_2001.pdf/15ffddf6-3767-4527-bfac-740a0400829b. Acesso em: 29 mar. 2019.

ANDREWS, W. H.; WANG, H.; JACOBSON, A.; HAMMACK, T. *Salmonella*. In: UNITED STATES FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. **Bacteriological Analytical Manual Online**. 8. ed. Rockville, 2018. Cap. 5. Disponível em: <https://www.fda.gov/Food/FoodScienceResearch/LaboratoryMethods/ucm2006949.htm>. Acesso em: 29 mar. 2019.

BD BBL **Coagulase Plasmas**. Maryland: Becton, Dickinson and Company; Shannon: BENEX Limited, 2004. 8810061. Disponível em: https://www.bd.com/europe/regulatory/Assets/IFU/US/8810061%280604%29_Ptc.pdf. Acesso em: 12 dez. 2018.

BRASIL. Decreto nº 9.013, de 29 de março de 2017. Regulamenta a lei nº 1283, de 18 de dezembro de 1950, e a lei nº 7889, de 23 de novembro de 1989, que dispõem sobre a inspeção industrial e sanitária de produtos de origem animal. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, 30 mar. 2017a. Disponível em: http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_ato2015-2018/2017/decreto/D9013.htm. Acesso em: 29 mar. 2019.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. **Manual de métodos oficiais para análise de alimentos de origem animal**. Brasília, DF, 2017b. 140 p. Disponível em: http://www.agricultura.gov.br/assuntos/laboratorios/legislacoes-e-metodos/poa/copy3_of_Manualdemtodosoficiaisparaanlisedealimentosdeorigemanimal1ed.rev_.pdf. Acesso em: 29 mar. 2019.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Decreto Nº 30.691, de 29 de março de 1952. Métodos analíticos oficiais físico-químicos para controle de leite e produtos lácteos. Regulamento da Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 07 de julho de 1952, n. 155, Seção I-Parte I, pág. 10.785. Disponível em: <https://www.defesa.agricultura.sp.gov.br/legislacoes/decreto-30691-de-29-03-1952,632.html>. Acesso em: 29 mar. 2019.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Portaria nº 146, de 07 de março de 1996. **Regulamento Técnico Geral para Fixação de Requisitos Microbiológicos de Queijos**. Brasília, DF, 1996. Disponível em: <https://www.defesa.agricultura.sp.gov.br/legislacoes/portaria-mapa-146-de-07-03-1996,669.html>. Acesso em: 29 mar. 2019.

COSTA JÚNIOR, L. C. G.; LIMA, R. R.; OLIVEIRA, A. C. Determinação do teor de extrato seco em produtos lácteos utilizando forno de microondas doméstico. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, Juiz de Fora, v. 55, n. 315, p. 220-232, 2000.

DAVIDSON, P. M.; ROTH, L. A.; GAMBREL-LENARZ, S. A. Coliform and other indicator bacteria. In: WEHR, H. M.; FRANK, J. P. (Ed.). **Standard Methods for the Examination of Dairy Products**, 17. ed. Washington D. C.: American Public Health Association, 2004. Cap. 7, p. 187-226.

DUTRA, E. R. P. **Fundamentos básicos da produção de queijos**. Juiz de Fora: Templo, 2017. 260 p.

DWIVEDI, H. P.; JAYKUS, L. A. Detection of pathogens in foods: the current state-of-the-art and future directions. **Clinical Microbiology Reviews**, Washington, DC, v. 37, p. 40-63, 2011.

ELIZAQUÍVEL, P.; AZNAR, R.; SÁNCHEZ, G. Recent developments in the use of the viability dyes and quantitative PCR in the food microbiology field. **Journal of Applied Microbiology**, Danvers, v. 116, p. 1-13, 2014.

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 (supl.), p. 162-165, 2003.

FENG, P.; WEAGANT, S. D.; KAREN J. Diarrheagenic *Escherichia coli*. In: U. S. FOOD AND DRUG ADMINISTRATION (Ed.). **Bacteriological Analytical Manual Online**. 8th ed. Rockville: FDA, 2018. Cap. 4A. Disponível em: <https://www.fda.gov/Food/FoodScienceResearch/LaboratoryMethods/ucm070080.htm>. Acesso em: 10 abr. 2019.

FURTADO, M. M. **Quesos típicos de latinoamérica**. São Paulo: Fonte Comunicações e Editora, 2005. 192 p.

FURTADO, M. M.; LOURENÇO NETO, J. P. **Tecnologia de queijos**: manual técnico para a produção industrial de queijos. São Paulo: Dipemar, 1994. 118 p.

HENNING, D. R.; FLOWERS, R.; REISER, R.; RYSER, E. T. Pathogens in milk and milk products. In: WEHR, H. M.; FRANK, J. F. (Ed.). **Standard Methods for the Examination of Dairy Products**, 17. ed. Washington D. C.: American Public Health Association, 2004. Cap. 5, p. 103-151.

HITCHINS, A. D.; JINNEMAN, K.; CHEN, Y. Detection and enumeration of *Listeria monocytogenes*. In: UNITED STATES FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. **Bacteriological Analytical Manual Online**. 8. ed. Rockville, 2017. Cap. 10. Disponível em: <https://www.fda.gov/Food/FoodScienceResearch/LaboratoryMethods/ucm071400.htm> Acesso em 29 mar. 2019.

INGHAM, S. C.; SU, Y. C.; SPANGENBERG, D. S. Survival of *Salmonella* Typhimurium and *Escherichia coli* O157:H7 in cheese brines. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 61, n. 1, p. 73-79, 2000.

INTERNATIONAL DAIRY FEDERATION. **Milk and milk products. Guidance on sampling**. Brussels: IDF, 2008. 40 p. (International Standard, ISO 707, IDF 50).

KORNACKI J. L.; JOHNSON, J. L. *Enterobacteriaceae*, coliforms and *Escherichia coli* as quality and safety indicators. In: DOWNES, F. P.; ITO, K. (Ed.). **Compendium of methods for the Microbiological Examination of Foods**. 4. ed. Washington D. C.: American Public Health Association, 2001. Chap. 8, p. 69-82.

LANCETTE, G. A.; BENNETT, R. W. *Staphylococcus aureus* and staphylococcal enterotoxins. In: DOWNES, F. P.; ITO, K. (Ed.). **Compendium of methods for the Microbiological Examination of Foods**, 4. ed. Washington D. C.: American Public Health Association, 2001. Cap. 39, p. 387-403.

NERO, L. A.; MATTOS, M. R.; BELOTI, V.; BARROS, M. A. F.; PINTO, J. P. A. N.; ANDRADE, N. J.; SILVA, W. P.; FRANCO, B. D. G. M. Leite cru de quatro regiões brasileiras: perspectivas de atendimento dos requisitos microbiológicos estabelecidos pela Instrução Normativa n. 51. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 25, n. 1, p. 191-195, 2005.

PAULA, J. C. J.; CARVALHO, A. F.; ALMEIDA, F. A.; COSTA, R. G. B.; SOBRAL, D.; MACHADO, G. M. Queijos Minas Frescal e Minas Padrão: características e tecnologia. **Informe Agropecuário**, v. 32, n. 262, p. 45-51, 2011.

PEREIRA, D. B. C.; SILVA, P. H. F.; COSTA JÚNIOR, L. C. G.; OLIVEIRA, L. L. **Físico-química do leite e derivados – métodos analíticos**. 2. ed. ampl. e rev. Juiz de Fora: EPAMIG, 2001. 234 p.

SÁ, J. F. O. **Caracterização microbiológica de doce de leite, leite condensado e queijo Minas Padrão por metodologia clássica e padronização de multiplex para detecção**

de patógenos por PCR em Tempo Real. 2012. 103 f. Dissertação (Mestrado Profissional em Ciência e Tecnologia do Leite e Derivados) – Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora.

SALOTTI, B. M.; CARVALHO, A. C. F. B.; AMARAL, L. A.; VIDAL-MARTINS, A. M. C.; CORTEZ, A. L. Qualidade microbiológica do queijo minas frescal comercializado no município de Jaboticabal, SP, Brasil. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 73, n. 2, p. 171-175, 2006.

SALVAT-BRUNAUD, D.; MAUBOIS, J. L.; LE GRAËT, Y.; PIOT, M.; MAILLARD, M. B.; CORRE, C.; THIERRY, A. Extraction et analyse de la phase aqueuse de l'emmental à 4 stades d'affinage. **Lait**, Paris, v. 75, n. 3, p. 239-249, 1995.

SANGALETTI, N. **Estudo da vida útil do queijo Minas Frescal disponível no mercado.** 2007. 80 p. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Escola Superior de Agricultura Luiz Queiroz. ESALQ/USP, Piracicaba, 2007.

SILVA, N.; JUNQUEIRA, V. C. A.; SILVEIRA, N. F. A.; TANIWAKI, M. H.; SANTOS, R. F. S.; GOMES, R. A. R. **Manual de Métodos de Análise Microbiológica de Alimentos e Água.** 4. ed. São Paulo: Livraria Varela, 2010.

THERMO ELECTRON CORPORATION. **Manual do usuário** - pH e ISE - Manual Medidor Orion série star (Análise, Detecção, Medição e Controle). 2012. 108 p.



Agroindústria Tropical

MINISTÉRIO DA
AGRICULTURA, PECUÁRIA
E ABASTECIMENTO



PÁTRIA AMADA
BRASIL
GOVERNO FEDERAL



CGPE 15491