

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA FACULDADE DE  
MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA  
CURSO DE GRADUAÇÃO EM MEDICINA VETERINÁRIA**

**CAMILA BRAMBILLA JOSÉ**

**ISOLAMENTO MICROBIOLÓGICO E CONFIRMAÇÃO MOLECULAR DE  
*Salmonella* spp. EM QUEIJOS MINAS FRESCAL NÃO INSPECIONADOS  
COMERCIALIZADOS EM FEIRAS LIVRES NO MUNICÍPIO DE UBERLÂNDIA  
(MG)**

**UBERLÂNDIA-MG**

**2026**

CAMILA BRAMBILLA JOSÉ

**ISOLAMENTO MICROBIOLÓGICO E CONFIRMAÇÃO MOLECULAR DE  
*Salmonella* spp. EM QUEIJOS MINAS FRESCAL NÃO INSPECIONADOS  
COMERCIALIZADOS EM FEIRAS LIVRES NO MUNICÍPIO DE UBERLÂNDIA  
(MG)**

Trabalho de conclusão de curso  
apresentado à Faculdade de Medicina  
Veterinária e Zootecnia da Universidade  
Federal de Uberlândia como requisito  
parcial à obtenção do grau de Médica  
Veterinária.

Orientador: Prof. Dr. Marcus Vinícius  
Coutinho Cossi.

UBERLÂNDIA-MG

2026

## RESUMO

O Queijo Minas Frescal (QMF) constitui um dos derivados lácteos de maior consumo no Brasil, devido ao seu elevado valor nutricional e ampla aceitação pelos consumidores. Entretanto, por apresentar elevado teor de umidade e ausência de maturação, constitui um alimento altamente suscetível à contaminação microbiológica quando produzido e comercializado sem inspeção sanitária e sem a adoção das Boas Práticas Agropecuárias e de Fabricação. Nessas condições, seu consumo pode representar risco à saúde pública, uma vez que produtos lácteos estão frequentemente envolvidos em surtos de Doenças de Origem Alimentar (DOA), destacando-se *Salmonella* spp. como um dos principais agentes etiológicos. Assim, o presente estudo teve como objetivo avaliar a ocorrência de *Salmonella* spp. em Queijos Minas Frescal não inspecionados comercializados em feiras livres do município de Uberlândia, Minas Gerais. Foram analisadas amostras de 25 queijos coletadas entre junho e julho de 2026. A detecção de *Salmonella* spp. foi realizada conforme a ISO 6579-1, seguida da confirmação molecular dos isolados por reação em cadeia da polimerase (PCR), utilizando os genes *ompC* e *invA*. A frequência de positividade para *Salmonella* spp. foi comparada com a legislação vigente (RDC nº 724/2022 e IN nº 161/2022) e entre os dias de coleta, pelo teste exato de Fisher, com nível de significância de 5% ( $p < 0,05$ ). Das 25 amostras avaliadas, 13 (52%) foram positivas para *Salmonella* spp. Foram obtidos 20 isolados, sendo dois positivos apenas para o gene *ompC*, seis exclusivamente para *invA* e doze positivos para ambos os genes. Observou-se associação significativa entre o dia de comercialização e a ocorrência de *Salmonella* spp. ( $p = 0,0414$ ), com maior frequência nas amostras coletadas às segundas-feiras (68,75%) em relação às quintas-feiras (22,22%). Além disso, os queijos comercializados às segundas-feiras apresentaram 7,70 vezes mais chances de serem positivos para *Salmonella* spp. (OR = 7,70; IC95%: 1,129–42,83). Os resultados evidenciam elevada ocorrência de *Salmonella* spp. em queijos não inspecionados, indicando risco à saúde pública e a necessidade de fortalecimento das medidas de controle sanitário.

**Palavras-chave:** Comércio Informal; Doenças de Origem Alimentar; Inspeção Sanitária; Queijo de Alta Umidade; *Salmonella* spp.

## ABSTRACT

Minas Frescal Cheese (MFC) is one of the most widely consumed dairy products in Brazil, owing to its high nutritional value and broad consumer acceptance. However, due to its high moisture content and lack of ripening, it is highly susceptible to microbiological contamination when produced and sold without sanitary inspection or the adoption of Good Agricultural and Manufacturing Practices. Under such conditions, its consumption can pose a public health risk, as dairy products are frequently implicated in foodborne disease outbreaks, with *Salmonella* spp. standing out as a primary etiological agent. Thus, this study aimed to evaluate the occurrence of *Salmonella* spp. in uninspected Minas Frescal Cheeses sold at open-air markets in the municipality of Uberlândia, Minas Gerais. Samples from 25 cheeses, collected between June and July 2026, were analyzed. *Salmonella* spp. detection was performed according to ISO 6579-1, followed by molecular confirmation of isolates via polymerase chain reaction (PCR) targeting the *ompC* and *invA* genes. The frequency of *Salmonella* spp. positivity was compared against current regulations (RDC nº 724/2022 and IN nº 161/2022) and across collection days using Fisher's exact test, with a significance level of 5% ( $p < 0,05$ ). Of the 25 samples evaluated, 13 (52%) tested positive for *Salmonella* spp. Twenty isolates were obtained: two tested positive only for the *ompC* gene, six exclusively for *invA*, and twelve tested positive for both genes. A significant association was observed between the day of sale and the occurrence of *Salmonella* spp. ( $p = 0,0414$ ), with a higher frequency in samples collected on Mondays (68,75%) compared to those collected on Thursdays (22,22%). Furthermore, cheeses sold on Mondays were 7,70 times more likely to test positive for *Salmonella* spp. (OR = 7,70; 95% CI: 1,129–42,83). The results demonstrate a high prevalence of *Salmonella* spp. in uninspected cheeses, indicating a public health risk and the need to strengthen sanitary control measures.

**Keywords:** Informal Trade; Foodborne Diseases; Sanitary Inspection; High-Moisture Cheese; *Salmonella* spp.

## SUMÁRIO

|          |                                                                                                                   |           |
|----------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>1</b> | <b>INTRODUÇÃO.....</b>                                                                                            | <b>6</b>  |
| <b>2</b> | <b>REVISÃO DE LITERATURA.....</b>                                                                                 | <b>8</b>  |
| 2.1      | O Queijo no Brasil: Ênfase em Minas Gerais e no Queijo Minas Frescal .....                                        | 8         |
| 2.2      | Métodos de produção do Queijo Minas Frescal .....                                                                 | 9         |
| 2.3      | Inspeção de Produtos de Origem Animal e sua aplicação aos queijos .....                                           | 11        |
| 2.4      | Dinâmicas do Mercado Informal em Feiras Livres.....                                                               | 13        |
| 2.5      | Microbiologia: indicadores de higiene e avaliação de patógenos como forma de garantir a segurança do queijo ..... | 14        |
| 2.5.1    | Indicadores de Higiene .....                                                                                      | 15        |
| 2.6      | Doenças de Origem Alimentar relacionada ao queijo.....                                                            | 17        |
| 2.6.1    | <i>Salmonella</i> spp.....                                                                                        | 18        |
| 2.6.2    | <i>Listeria monocytogenes</i> .....                                                                               | 19        |
| 2.6.3    | <i>Staphylococcus aureus</i> .....                                                                                | 19        |
| 2.6.4    | <i>Escherichia coli</i> .....                                                                                     | 20        |
| <b>3</b> | <b>MATERIAL E MÉTODOS .....</b>                                                                                   | <b>22</b> |
| 3.1      | Coleta de amostras .....                                                                                          | 22        |
| 3.2      | Análise Microbiológica .....                                                                                      | 22        |
| 3.2.1    | Identificação de <i>Salmonella</i> spp.....                                                                       | 23        |
| 3.2.2    | Confirmação molecular de <i>Salmonella</i> spp.- Genes <i>ompC</i> e <i>invA</i> .....                            | 24        |
| 3.3      | Análise de dados .....                                                                                            | 25        |
| <b>4</b> | <b>RESULTADOS .....</b>                                                                                           | <b>26</b> |
| <b>5</b> | <b>DISCUSSÃO.....</b>                                                                                             | <b>28</b> |
| <b>6</b> | <b>CONCLUSÃO .....</b>                                                                                            | <b>30</b> |
|          | <b>REFERÊNCIAS .....</b>                                                                                          | <b>31</b> |

## 1 INTRODUÇÃO

O Queijo Minas Frescal (QMF) constitui um dos derivados lácteos de maior consumo no Brasil, impulsionado por seu elevado valor nutricional, sabor suave, textura macia e expressiva aceitação no mercado. Trata-se de um queijo fresco, obtido por coagulação enzimática e destinado ao consumo imediato, sem etapa de maturação. Segundo a legislação brasileira, é classificado como um produto de muito alta umidade (superior a 55%). Essa característica, aliada à elevada atividade de água ( $A_w > 0,95$ ) e ao pH próximo à neutralidade, favorece a proliferação de microrganismos deteriorantes e patogênicos (Brasil, 1997, 2004, 2017; Coelho *et al.*, 2021; Souza *et al.*, 2017).

Embora a legislação estabeleça a obrigatoriedade do uso de leite pasteurizado e o cumprimento de rígidas medidas higiênico-sanitárias ao longo da cadeia produtiva e comercial, a venda informal do Queijo Minas Frescal (QMF) segue amplamente difundida no país, sobretudo em feiras livres. Apesar do seu relevante papel socioeconômico na geração de renda para pequenos produtores e comerciantes locais, essa prática frequentemente ocorre à margem da fiscalização sanitária oficial. A ausência desse controle, somada às falhas no rigor da cadeia de frio e ao descumprimento das Boas Práticas Agropecuárias (BPA) e de Fabricação (BPF), compromete criticamente a qualidade microbiológica desse queijo, elevando os riscos à saúde do consumidor (Amaral *et al.*, 2020; Brasil, 2017; Lima *et al.*, 2026; Ferreira *et al.*, 2011; Matos *et al.*, 2015; Piza *et al.*, 2023).

Nesse cenário, tanto a qualidade da matéria-prima quanto às falhas no processamento, estocagem e distribuição podem viabilizar a contaminação por patógenos veiculados por alimentos, a exemplo de *Salmonella* spp., *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes* e *Staphylococcus aureus* (Camargo *et al.*, 2021; Brasil, 2020). Dentre eles, a *Salmonella* spp. sobressai como um dos principais agentes etiológicos de Doenças de Origem Alimentar (DOA), frequentemente associado a surtos de gastroenterite de grande impacto em saúde pública. Dados do Ministério da Saúde ratificam que as DOAs constituem um desafio sanitário persistente no Brasil, com histórico expressivo de surtos vinculados ao consumo de leite e derivados contaminados por esse microrganismo (Brasil, 2024; Lima *et al.*, 2023).

A salmonelose, adquirida pela ingestão de alimentos contaminados, manifesta-se em quadros entéricos clássicos — com diarreia, febre, dor abdominal, náuseas e

vômitos —, podendo evoluir para formas sistêmicas e invasivas em grupos vulneráveis. Em razão dessa gravidade epidemiológica, a legislação nacional impõe parâmetros microbiológicos rigorosos para o seu controle. Atualmente, a Resolução RDC nº 724/2022 e a Instrução Normativa IN nº 161/2022, ambas da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), exigem a ausência de *Salmonella* spp. em 25 g de queijos de alta umidade. Portanto, a identificação desse patógeno atesta a não conformidade com os padrões sanitários vigentes e consolida um cenário de risco iminente à saúde pública (Almeida, 2015; Brasil, 2022a, 2022b; FDA, 2012; Trabulsi; Alterthum, 2016).

Diante do exposto, o presente estudo teve como objetivo realizar o isolamento microbiológico e a confirmação molecular de *Salmonella* spp. em Queijos Minas Frescal não inspecionados, comercializados em feiras livres do município de Uberlândia, Minas Gerais. Dessa forma, buscou-se identificar *Salmonella* spp. por meio da metodologia preconizada pela ISO 6579-1, confirmar molecularmente os isolados pela reação em cadeia da polimerase (PCR), mediante a detecção dos genes *ompC* e *invA*, determinar a frequência de amostras positivas e avaliar a ocorrência do microrganismo conforme os diferentes dias de comercialização, verificando a possível associação entre o dia de coleta e a positividade. Ademais, os achados foram avaliados em relação aos padrões microbiológicos estabelecidos pela legislação vigente e comparados com evidências científicas disponíveis, visando contribuir para a avaliação da qualidade microbiológica do produto e dos potenciais riscos à saúde pública.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 O Queijo no Brasil: Ênfase em Minas Gerais e no Queijo Minas Frescal

A produção de queijo constitui uma das mais antigas práticas alimentares da humanidade, com evidências arqueológicas que indicam sua origem há aproximadamente 8.000 anos, durante a Revolução Neolítica, no Crescente Fértil, período marcado pela domesticação de animais e pelo desenvolvimento da atividade leiteira. No Brasil, essa tradição foi introduzida no período colonial, com a chegada dos portugueses, que trouxeram bovinos, caprinos e os conhecimentos relacionados à produção de derivados lácteos, estabelecendo as bases para o desenvolvimento da atividade queijeira no país (Paula *et al.*, 2009; Dias, 2010).

Em Minas Gerais, a produção de queijos consolidou-se no século XVIII, coexistindo com a exploração aurífera, período em que desempenhou um papel crucial no abastecimento alimentar das populações locais. Nesse contexto, surgiu o Queijo Minas Artesanal (QMA), cuja produção foi inspirada nas técnicas portuguesas empregadas na fabricação do queijo Serra da Estrela, sendo posteriormente adaptada às condições ambientais, culturais e produtivas das fazendas mineiras. Ao longo dos séculos, o QMA consolidou-se como um importante símbolo da identidade cultural, econômica e gastronômica do estado de Minas Gerais (Melo; Silva, 2014).

Em reconhecimento à sua relevância histórica e cultural, o modo de fazer o Queijo Minas Artesanal foi registrado, em 2008, pelo Instituto do Patrimônio Histórico e Artístico Nacional (IPHAN), como Patrimônio Cultural Imaterial do Brasil. De acordo com a legislação vigente, o QMA é produzido exclusivamente a partir de leite cru, sendo sua identidade sensorial atribuída à combinação entre a região de produção, o processo de maturação e a utilização do "pingo", fermento natural obtido do soro da fabricação anterior, rico em bactérias ácido-láticas. Além desses fatores, características do rebanho, alimentação dos animais, condições edafoclimáticas e práticas tradicionais de fabricação e maturação contribuem para a singularidade microbiológica e sensorial desse produto (IPHAN, 2008; Bombachi *et al.*, 2024).

Diferentemente de seu predecessor artesanal, o Queijo Minas Frescal (QMF) surgiu como uma variedade destinada ao consumo imediato, sendo tipificado tecnicamente como um produto fresco, de coagulação enzimática e que dispensa o processo de maturação. Conforme Instrução Normativa nº 4, de 01 de março de 2004,

o QMF é classificado como um queijo de muito alta umidade, apresentando teor de umidade superior a 55%. Em razão dessa característica, associada à elevada atividade de água ( $A_w > 0,95$ ), ao pH próximo da neutralidade e à ausência do processo de maturação, o produto constitui um ambiente altamente favorável ao desenvolvimento de microrganismos deteriorantes e patogênicos. Dessa forma, a legislação brasileira estabelece a obrigatoriedade da utilização de leite pasteurizado em sua fabricação, como medida essencial para garantir a segurança microbiológica e a inocuidade do alimento, além da manutenção da cadeia de refrigeração e a adoção de Boas Práticas de Fabricação (Brasil, 1997, 2004, 2017; Souza *et al.*, 2017).

Sob a perspectiva econômica, o Queijo Minas Frescal destaca-se entre os derivados lácteos de maior consumo no Brasil. Dessa forma, sua produção caracteriza-se pelo processamento simplificado, elevado rendimento, menor tempo de fabricação e rápido retorno do investimento; tais fatores favorecem sua fabricação por laticínios de diferentes portes em todo o território nacional. Além disso, o QMF integra um segmento de grande relevância para a cadeia produtiva do leite, contribuindo para a agregação de valor à matéria-prima e para o fortalecimento da indústria de laticínios brasileira (ABLV, 2025; Coelho *et al.*, 2021).

Em relação às suas características físico-químicas e sensoriais, o QMF apresenta massa branca, consistência mole, sem casca, textura fechada com algumas olhaduras irregulares, e sabor suave a levemente ácido, atributos que favorecem sua elevada aceitação pelos consumidores. Além do apelo gastronômico, o produto apresenta expressivo valor nutricional por ser uma fonte primordial de cálcio e proteínas de alta digestibilidade (ABIQ, 2024; Brasil, 1997).

## **2.2 Métodos de produção do Queijo Minas Frescal**

A produção do Queijo Minas Frescal (QMF) é fundamentada por Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade (RTIQ) específico, que o define como um produto fresco obtido por coagulação enzimática do leite, podendo ser complementado ou não por culturas de bactérias lácticas específicas (Brasil, 1997). Por se tratar de um produto de elevada perecibilidade, a qualidade da matéria-prima constitui um dos principais fatores determinantes para o rendimento da produção e a segurança microbiológica do produto. Assim, antes do processamento, o leite deve atender aos padrões físico-químicos e microbiológicos estabelecidos pela legislação, sendo

submetido às provas de plataforma, que incluem testes de estabilidade ao alizarol, acidez titulável, densidade, teor de gordura e pesquisa de substâncias conservadoras e resíduos de antimicrobianos (Brasil, 1997, 2019a).

A princípio, o processo de pasteurização do leite cru representa uma etapa obrigatória na fabricação do QMF. Tal tratamento térmico pode ser realizado pelo método lento, entre 63 °C e 65 °C durante 30 minutos, ou pelo método rápido, entre 72 °C e 75 °C por 15 a 20 segundos. Embora seja fundamental para a eliminação de patógenos, como *Salmonella* spp. e *Listeria monocytogenes*, a pasteurização reduz a disponibilidade de cálcio iônico no leite, tornando necessária a adição de cloreto de cálcio para favorecer a ação do coagulante e garantir a formação de uma coalhada firme e com bom rendimento (Brasil 2017; Silva, 2005; Senar, 2010).

Após o resfriamento do leite à temperatura de coagulação (32 °C a 35 °C), podem ser adicionadas culturas iniciadoras de bactérias ácido-láticas, cuja principal função é promover a acidificação controlada da massa, inibir o crescimento de microrganismos indesejáveis e favorecer as características sensoriais do produto. Em algumas tecnologias de fabricação, a acidificação direta com ácido láctico também pode ser empregada para reduzir o tempo de processamento e aumentar a retenção de umidade, resultando em um produto de sabor mais acentuado. Na sequência, adiciona-se o coagulante enzimático, geralmente quimosina ou renina, promovendo a formação da coalhada em aproximadamente 40 a 60 minutos (Bonassi; Goldini; Lima, 1980; Alves *et al.*, 2003; Paula *et al.*, 2009, 2018; Silva *et al.*, 2019).

Após a coagulação, a massa é cortada em cubos de aproximadamente 1,5 a 2,0 cm e submetida à mexedura lenta, etapa responsável por favorecer a sinérese, processo de expulsão do soro que influencia diretamente a umidade, a textura e o rendimento do queijo. Diferentemente dos queijos maturados, o QMF não é submetido à prensagem mecânica, sendo a compactação da massa promovida apenas pelo seu próprio peso durante a enformagem. Posteriormente, é realizada a primeira viragem do queijo nas formas após 15 minutos de repouso e a segunda viragem após 30 minutos da primeira. Em seguida, realiza-se a salga, que pode ocorrer diretamente no leite, na massa, por imersão em salmoura ou por aplicação superficial de sal, sendo esta última considerada uma das alternativas mais empregadas na fabricação do Queijo Minas Frescal devido distribuição mais uniforme e à preservação das características sensoriais do produto (Oliveira, 1986; Furtado *et al.*, 1998; Paula *et al.*, 2009; Silva, 2005).

Concluída a fabricação, os queijos são desenformados, embalados em materiais apropriados para contato com alimentos e armazenados sob refrigeração, preferencialmente em temperaturas iguais ou inferiores a 8 °C para preservar suas características físico-químicas, sensoriais e microbiológicas durante a vida útil. Em razão do elevado teor de umidade e da ausência de maturação, o controle rigoroso da temperatura de armazenamento constitui um dos principais fatores para garantir a qualidade e a segurança do Queijo Minas Frescal até o consumo (Lima; Penna, 2012; Brasil, 2017).

### **2.3 Inspeção de Produtos de Origem Animal e sua aplicação aos queijos**

A partir da década de 1950, foram instituídas no Brasil sucessivas normas voltadas à obrigatoriedade de fiscalização, sob o ponto de vista industrial e sanitário, da produção e comercialização de todos os produtos de origem animal (POA). Dentre elas, a Lei Federal 1.283, de 18 de dezembro de 1950, e o Regulamento de Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal (RIISPOA), através do Decreto Federal 30.691/1952, que introduziram as primeiras diretrizes técnicas para o processamento de produtos lácteos e a tipificação oficial dos queijos mineiros (Brasil, 1950; Brasil, 1952).

De acordo com a Lei Federal 7.889/1989 até o presente momento, a competência fiscalizatória dos POAs tornou-se descentralizada, permitindo que os serviços de inspeção operem nas esferas Federal, Estadual e Municipal, conforme o âmbito de comercialização pretendido pelo estabelecimento. Além disso, nenhum estabelecimento industrial ou entreposto desses produtos pode funcionar no país sem ter o registro no órgão competente de fiscalização da sua atividade. Sobre a competência supracitada, a divisão se baseia em barreiras geográficas como limitante comercial, ou seja, uma empresa registrada no Serviço de Inspeção Municipal (SIM) não poderia expor à venda seus produtos para outro município, o mesmo acontecendo com os Serviços Estaduais de Inspeção (SIE), que estabeleceram limites territoriais estaduais como barreira ao comércio. O terceiro e último elo de competência é dado pelo Serviço de Inspeção Federal que permite à empresa inspecionada comercializar seu produto em todos os estados da União, tendo ainda a chance de exportar seu produto (Brasil, 1952; Brasil, 1989; Brasil, 2017).

O Brasil avançou na inspeção e fiscalização de queijos de produção

nacional com a promulgação do Decreto nº 5.741, de 30 de março de 2006, para incluir dispositivos sobre defesa agropecuária, estruturando bases para a organização do Sistema Unificado de Atenção à Sanidade Agropecuária (SUASA) e o Sistema Brasileiro de Inspeção de Produtos de Origem Animal (SISBI-POA), fortalecendo o controle sanitário no país. Nesse cenário, o MAPA implementou o SISBI-POA como instrumento de promoção da saúde pública por meio da vigilância e defesa sanitária animal, permitindo que produtos antes restritos aos âmbitos municipal (SIM) e estadual (SIE) pudessem ser comercializados em todo o território nacional, desde que atendessem às exigências do sistema e os serviços fossem considerados equivalentes ao federal (Brasil, 2006; Araújo *et al.*, 2020).

Em 2018, foi publicada a Lei nº 13.860 que regulamenta especificamente a produção artesanal de alimentos e autoriza a comercialização interestadual desses produtos, desde elaborados por meio de métodos tradicionais ou regionais, com adoção de boas práticas agropecuárias e de fabricação, além de estarem submetidos à fiscalização pelos órgãos de saúde pública dos Estados ou do Distrito Federal (Brasil, 2018). Dessa forma, os produtos reconhecidos como artesanais, como o Queijo Minas Artesanal (QMA), devem ser identificados por meio da certificação oficial denominada Selo ARTE, que atesta sua conformidade com os requisitos legais e sanitários estabelecidos (Brasil, 2022a; Santos *et al.*, 2025).

No contexto de normas técnicas sanitárias, vale destacar a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), entidade encarregada de regulamentar a irradiação de alimentos, visando assegurar a qualidade sanitária desses produtos. As diretrizes iniciais foram estabelecidas pela Resolução de Diretoria Colegiada (RDC) nº 21/2001, que definiu critérios microbiológicos para diferentes categorias alimentares. Posteriormente essa normativa foi atualizada pela RDC nº 331/2019 e complementada pela Instrução Normativa (IN) nº 60/2019, trazendo critérios microbiológicos específicos para diversos grupos de alimentos. Em 1º de julho de 2022, foi promulgada a RDC nº 724 em conjunto com a IN nº 161/2022, instituindo um novo conjunto de padrões microbiológicos aplicáveis aos alimentos, inclusive aos produtos lácteos. Ambas substituíram as anteriores - RDC nº 331/ 2019 e IN nº 60. (Brasil, 2001; Brasil, 2019<sup>a</sup>; Brasil, 2019b; Brasil, 2022a; Brasil, 2022b).

No caso específico do Queijo Minas Frescal, a Portaria nº 352/1997 do MAPA, estabeleceu os requisitos físico-químicos originais, classificando-o como queijo de alta umidade e semigordo. Contudo, a Instrução Normativa nº 04/2004 alterou essa

classificação, passando a tipificá-lo oficialmente como um queijo de "muito alta umidade" (teor superior a 55%). Mais recentemente, a segurança microbiológica do produto passou a ser regida pela RDC nº 724/2022 e pela Instrução Normativa nº 161/2022 da ANVISA, que estipulam a ausência compulsória de patógenos e limites rigorosos para microrganismos indicadores de higiene em produtos prontos para o consumo (Brasil, 1997, 2004; 2022a, 2022b).

Assim, conforme a IN nº 161/2022, os padrões microbiológicos são expressos, em Unidades Formadoras de Colônia por grama (UFC/g) ou por porção da amostra, além de critérios de ausência ou presença de microrganismos patogênicos. Para produtos lácteos prontos para consumo, categoria na qual se inserem os queijos minas frescal, estabelecem-se, de modo geral, os seguintes parâmetros: ausência de *Salmonella* spp. em 25 g; ausência de *Listeria monocytogenes* em 25 g; limites para *Staphylococcus aureus* coagulase positiva, usualmente até  $10^2$  UFC/g; e limites para *Escherichia coli* e coliformes, até  $10^2$  UFC/g, conforme classificação de umidade e maturação do queijo artesanal. Para queijos ralados ou em pó e queijos com umidade acima de 46%, é permitida a presença de até  $10^2$  UFC/g, enquanto para queijos com umidade inferior a 46%, o limite é de 10 UFC/g (Brasil, 2022b).

## 2.4 Dinâmicas do Mercado Informal em Feiras Livres

As feiras livres constituem uma das formas mais tradicionais de comercialização de produtos agropecuários e alimentícios no Brasil, desempenhando importante papel no abastecimento da população e na geração de renda para pequenos produtores e comerciantes. Entretanto, a comercialização de alimentos nesses espaços frequentemente ocorre em condições higiênico-sanitárias inadequadas, caracterizadas por deficiências estruturais, conservação inadequada dos alimentos e fiscalização sanitária insuficiente, fatores que favorecem a contaminação microbiológica e representam um importante risco à saúde pública (Lima *et al.*, 2026; Silva *et al.*, 2023).

Entre os principais fatores de risco observados nas feiras livres destacam-se o manuseio simultâneo de alimentos e dinheiro, a inadequação estrutural das bancas de comercialização, a higienização deficiente das mãos e dos utensílios, a ausência de Equipamentos de Proteção Individual (EPIs), a indisponibilidade de água potável e

o armazenamento inadequado dos alimentos. Essas práticas favorecem a contaminação cruzada e comprometem a qualidade dos produtos comercializados no mercado informal (Ferreira *et al.*, 2011; Matos *et al.*, 2015).

Nesse contexto, o Queijo Minas Frescal (QMF) comercializado sem inspeção sanitária oficial merece atenção especial devido à sua elevada perecibilidade. Suas características intrínsecas, como o elevado teor de umidade e o pH próximo da neutralidade, favorecem o desenvolvimento de microrganismos deteriorantes e patogênicos. Além disso, a produção informal frequentemente ocorre sem a pasteurização do leite e sem a adoção das Boas Práticas de Fabricação (BPF), enquanto sua comercialização é realizada sem refrigeração adequada e em embalagens impróprias, aumentando significativamente o risco de contaminação microbiológica (Perry, 2004; Amaral *et al.*, 2020; Piza *et al.*, 2023).

A permanência desse mercado informal é influenciada por fatores econômicos, sociais e culturais. O baixo custo de produção, o elevado rendimento do queijo e o preço mais acessível ao consumidor favorecem sua comercialização. Paralelamente, a preferência de parte dos consumidores pelo sabor considerado mais "caseiro", associada ao desconhecimento dos riscos relacionados ao consumo de produtos sem inspeção sanitária, contribui para a manutenção dessa prática em diferentes regiões do país (Amorim *et al.*, 2014; Garcia *et al.*, 2016).

## **2.5 Microbiologia: indicadores de higiene e avaliação de patógenos como forma de garantir a segurança do queijo**

A microbiologia do Queijo Minas Frescal (QMF) constitui um aspecto fundamental para a garantia da qualidade e da segurança do alimento. Nesse contexto, o leite *in natura*, utilizado na produção desse queijo, apresenta uma microbiota natural diversificada. Além disso, ao longo das etapas de processamento, o produto pode ser exposto à contaminação proveniente dos manipuladores, dos utensílios, dos equipamentos e do ambiente de produção. Em razão de seu elevado valor nutricional e alto teor de umidade, o QMF oferece condições favoráveis à multiplicação de diversos microrganismos, incluindo aqueles responsáveis pela deterioração do produto e microrganismos patogênicos capazes de comprometer a saúde do consumidor (Amaral *et al.*, 2020; Amorim *et al.*, 2014).

A obtenção da matéria-prima no Queijo Minas Frescal (QMF) representa um dos principais pontos críticos para a segurança do produto, uma vez que qualidade microbiológica do leite está diretamente associada à sanidade do rebanho, ao controle de mastite, à higiene na ordenha, à potabilidade da água e à adequada higienização de equipamentos e instalações. Nesse sentido, a implementação rigorosa das Boas Práticas Agropecuárias (BPA) é indispensável para reduzir a carga microbiana inicial e minimizar riscos de contaminação por microrganismos indicadores e patogênicos. Essas medidas estão alinhadas às diretrizes sanitárias nacionais estabelecidas pelo Ministério da Agricultura e Pecuária, especialmente no Decreto nº 9.013/2017 (RIISPOA), que dispõe sobre a inspeção industrial e sanitária de produtos de origem animal (Bombachi *et al.*, 2024; Brasil, 2017).

No âmbito da fabricação, as Boas Práticas de Fabricação (BPF) devem ser implementadas em todas as etapas do processo produtivo, conforme estabelece a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) por meio da Resolução RDC nº 275/2002, que dispõe sobre Procedimentos Operacionais Padronizados (POPs) e lista de verificação das BPF em estabelecimentos produtores de alimentos. No caso específico do queijo mineiro, as normas estaduais de Minas Gerais, sob coordenação do Instituto Mineiro de Agropecuária, complementam essas exigências ao estabelecer critérios estruturais para queijarias, controle de processos, rastreabilidade e fiscalização sanitária (Brasil, 2002; Minas Gerais, 2002, 2021).

### 2.5.1 Indicadores de Higiene

Os microrganismos indicadores de higiene são definidos como grupos, gêneros ou espécies microbianas que, quando presentes em populações elevadas, indicam falhas nas práticas higiênico-sanitárias para obtenção, processamento ou preservação do alimento. Nesse contexto, os grupos comumente utilizados como indicadores de higiene, incluem mesófilos, coliformes e psicrotróficos (Camargo *et al.*, 2021).

Os mesófilos são microrganismos que crescem em faixas de temperaturas mesofílicas, entre 25 e 37 °C, sob condições aeróbias. Esse grupo compreende inúmeros gêneros, dentre eles alguns que podem ser consideradas potencialmente patogênicas, incluindo algumas capazes de produzir esporos (Camargo *et al.*, 2021).

Os coliformes são divididos em dois grupos: grupo dos coliformes a 35°, o qual

inclui as bactérias na forma de bastonetes Gram-negativos, não-esporulados, aeróbios ou anaeróbios facultativos, fermentadores de lactose com produção de ácido e gás em 24 a 48 horas a 35/37°C, que são indicadores de qualidade higiênico sanitária; e o grupo dos coliformes a 45°, o qual a temperatura para a fermentação da lactose e produção de gás se estende de 44,5 °C a 45,5 °C, que são possíveis indicadores de contaminação fecal em alimentos. Entre as bactérias desse grupo, podemos citar a *Escherichia coli* e algumas bactérias do gênero *Klebsiella*, *Citrobacter* e *Enterobacter* (Franco e Landgraf, 2013).

A bactéria *Escherichia coli* é mundialmente utilizada como indicador para analisar contaminação de origem fecal em alimentos e água, já que esse microrganismo é a única entre os indicadores fecais que estão presentes exclusivamente no trato digestório do homem e animais (Jay, 2005). Entretanto, atualmente sabe-se que algumas cepas de *Enterobacter* e *Klebsiella* não são de origem fecal, por esse motivo, a determinação de coliformes a 45°C em alimentos é menos representativa como indicação de contaminação fecal do que a enumeração direta de *Escherichia coli*, embora esta espécie possa ser introduzida nos alimentos a partir de fontes não fecais (Vanetti, 2003; Franco e Landgraf, 2013).

A microbiota psicrotrófica é composta por organismos Gram-negativos (por exemplo, espécies dos gêneros *Achromobacter*, *Aeromonas*, *Alcaligenes*, *Chromobacterium*, *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Flavobacterium*, *Klebsiella*, *Pseudomonas*, *Serratia* e *Yersinia*) e bactérias Gram-positivas (por exemplo, *Arthrobacter*, *Bacillus*, *Corynebacterium*, *Clostridium*, lactobacilos, *Listeria*, *Microbacterium*, *Micrococcus* e *Streptococcus*) capazes de se multiplicar em temperaturas de refrigeração. A maioria desses microrganismos no leite cru são provenientes do solo, água, vegetação e fezes. Essas bactérias estão ligadas a níveis aumentados de proteases e lipases exógenas estáveis ao calor. O gênero *Pseudomonas* destaca-se como o mais relevante para os produtos lácteos, apresentando elevado potencial de deterioração (Camargo *et al.*, 2021; D'Amico 2014).

Diferentes espécies de fungos também podem atuar na deterioração de produtos lácteos, produzindo sabores indesejáveis e compostos prejudiciais à saúde, como micotoxinas. Esses microrganismos são encontrados no solo e em salas de ordenha, sendo disseminados pelo ar na forma de esporos. Atualmente, são conhecidas mais de cem espécies de fungos que causam deterioração de alimentos,

a maioria delas dos gêneros *Penicillium*, *Aspergillus*, *Candida* (Camargo et al., 2021).

## 2.6 Doenças de Origem Alimentar relacionada ao queijo

De acordo com o Ministério da Saúde, surtos de Doenças de Origem Alimentar (DOA) ocorrem quando dois ou mais casos de indivíduos apresentam sinais e/ou sintomas semelhante após a ingestão de alimentos e/ou água com a mesma origem, com exceção para os casos de cólera e botulismo, os quais basta apenas um caso para ser considerado surto (Brasil, 2021).

Conforme dados apresentados no Boletim Epidemiológico da Secretaria de Vigilância em Saúde, publicado pelo Ministério da Saúde em 2020, observou-se que, entre 2016 e 2019, o número de registros de DOA permaneceu relativamente constante em relação aos anos anteriores. Nesse intervalo, foram contabilizados 2.504 surtos, envolvendo 37.247 indivíduos em todo o país. Dentre esses surtos, 541 apresentaram identificação do agente etiológico. Entre os patógenos detectados, destacaram-se *Escherichia coli*, responsável por aproximadamente 193 ocorrências, *Salmonella* spp., associada a 81 episódios, e *Staphylococcus aureus*, relacionado a 62 casos confirmados. O referido boletim evidenciou ainda que, no período analisado, 81 episódios de intoxicação alimentar estiveram vinculados ao consumo de leite e seus derivados contaminados, ressaltando a relevância desses produtos como potenciais veículos de Doenças de Origem Alimentar (DOA) no país (Brasil, 2020).

De acordo com o Informe-2024, publicado em março de 2024 pelo Ministério da Saúde, no período de 2014 a 2023 foram notificados 6.874 surtos de Doenças de Origem Alimentar (DOA), totalizando 110.614 casos e 121 óbitos. No que se refere aos agentes etiológicos identificados, observou-se a predominância de bactérias, com destaque para *Escherichia coli* (34,8%), *Staphylococcus aureus* (9,7%) e *Salmonella* spp. (9,6%), evidenciando a relevância desses microrganismos na ocorrência de surtos no país. Ademais, quanto à distribuição dos alimentos implicados, o grupo “leite e derivados” correspondeu a 6,7 dos surtos notificados no período, reforçando a importância do controle higiênico-sanitário na cadeia produtiva de queijos (Brasil, 2024).

Além disso, segundo informações divulgadas pela Secretaria de Estado de Saúde de Minas Gerais (SES-MG), em julho de 2025, o estado de Minas Gerais registrou um aumento nos casos de DOA monitoradas pelo sistema de vigilância

epidemiológica estadual. Em 2023, foram notificados 1.667 casos, enquanto em 2024 esse número alcançou 5.823 registros. Observou-se também o crescimento nas Doenças Diarreicas Agudas, frequentemente associadas às DOA, com 822.036 casos notificados em 2024 e 386.447 casos registrados em 2025, até o momento da divulgação (Minas Gerais, 2025).

Nesse contexto, o leite e seus derivados formam um dos imprescindíveis grupos de alimentos envolvidos em surtos de DOA no Brasil. Dessa forma, microrganismos como *Salmonella* spp., *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, apresentam a potencial de multiplicação em queijos artesanais produzidos sem atender às Boas Práticas de Fabricação (BPF), atuando como indicadores de deficiências higiênico-sanitárias e representando risco à saúde do consumidor (Brasil, 2019c; Lima *et al.*, 2023).

#### 2.6.1 *Salmonella* spp.

O gênero *Salmonella* integra a família *Enterobacteriaceae* e é composto por bacilos Gram-negativos, não formadores de esporos, anaeróbios facultativos e, em sua maioria, móveis. Essas bactérias fermentam glicose com produção de gás e apresentam teste de oxidase negativo. A faixa de temperatura de multiplicação varia entre 5 e 46° C, com temperatura ótima situada entre 35 e 43° C. Em relação ao pH, multiplicam-se em valores que variam de 3,8 a 9,5, sendo o intervalo ideal próximo da neutralidade (7,0 a 7,5). A atividade de água mínima necessária para seu desenvolvimento é em torno de 0,94 (Trabulsi; Alterthum, 2016).

Atualmente, já foram descritos mais de 2.500 sorotipos de *Salmonella*, sendo a maioria patogênica para o homem. As manifestações clínicas variam conforme o sorotipo envolvido, os mecanismos de virulência e as condições imunológicas do hospedeiro. Entre as principais enfermidades causadas por *Salmonella*, destacam-se a febre tifoide causada por *Salmonella typhi*; a febre entérica causada por *Salmonella paratyphi*; e as salmoneloses caracterizadas por quadros de gastroenterite, causadas pelos outros sorotipos de *Salmonella*, cuja veiculação está associada à ingestão de água e alimentos contaminados. Tal bactéria pode estar presente em diferentes etapas da cadeia produtiva, desde a matéria-prima até o produto final, sendo a contaminação cruzada uma via frequente de disseminação (FDA, 2012; Almeida, 2015; Trabulsi; Alterthum, 2016).

### 2.6.2 *Listeria monocytogenes*

A *Listeria monocytogenes* é uma bactéria pertencente à família *Listeriaceae*. Trata-se de um bacilo Gram-positivo, não esporogênico, móvel e anaeróbio facultativo, que necessita da presença de carboidratos para se multiplicar. Produz ácido a partir da glicose e de outros açúcares, porém não forma gás, sendo catalase positiva e oxidase negativa. Apresenta crescimento em faixa de pH entre 6,0 e 9,0, tolera elevadas concentrações de sal e é capaz de se multiplicar em temperaturas que variam de 4 °C a 50 °C, característica que a classifica como psicotrófica; contudo, não resiste ao processo de pasteurização (Gonzales-Barron *et al.*, 2020; Trabulsi; Alterthum, 2016).

Esse microrganismo é amplamente distribuído no ambiente, podendo ser isolado de plantas, solo, águas superficiais, esgoto, silagem, resíduos de abatedouros, leite de vacas sadias ou com mastite, além de fezes humanas e de diferentes espécies animais, como bovinos e aves. Sua capacidade de formar biofilmes favorece a persistência em superfícies e equipamentos, tornando-a frequente em ambientes de processamento de alimentos (Buchanan *et al.*, 2017).

A ingestão de alimentos contaminados pode resultar em duas formas clínicas distintas: uma apresentação não invasiva, caracterizada por quadro de gastroenterite, e outra invasiva, mais grave, quando a bactéria alcança a corrente sanguínea, ocasionando septicemia e podendo disseminar-se para o sistema nervoso central, causando meningite e outras complicações potencialmente fatais (FDA, 2012). No contexto de queijos artesanais elaborados com leite cru, a ocorrência relativamente baixa de positividade para *L. monocytogenes*, apesar de sua ampla distribuição ambiental, pode estar relacionada tanto à limitação de sensibilidade dos métodos de detecção empregados quanto à competição microbiana exercida pelas bactérias lácticas presentes nesses produtos (Nero *et al.*, 2008; Gonzales-Barron *et al.*, 2020).

### 2.6.3 *Staphylococcus aureus*

No que se refere aos principais patógenos envolvidos em intoxicações alimentares, a *Staphylococcus aureus* é uma bactéria Gram positiva, imóvel, não esporogênica, anaeróbia facultativa, de forma esférica que se divide em múltiplos

planos, originando agrupamentos característicos semelhantes a cachos de uva. Classifica-se como mesófila, com capacidade de multiplicação entre 7 °C e 47,8 °C, sendo a temperatura ótima em torno de 35 °C. Desenvolve-se em ampla faixa de pH, variando de 4,5 a 9,3, com ótimo entre 7,0 e 7,5. A atividade de água ideal situa-se próxima de 0,99; entretanto, mantém crescimento satisfatório em valores de até 0,83, característica incomum entre bactérias patogênicas de relevância em alimentos, que, em geral, não toleram baixa atividade de água (Trabulsi; Alterthum, 2016).

A maioria das cepas são tolerantes ao sal, mas sensíveis ao calor, sendo facilmente destruídas pelo processo de pasteurização. Essa espécie expressa diversos fatores de virulência, o que lhe confere potencial para causar diferentes manifestações clínicas em humanos, agrupadas em três categorias principais: infecções superficiais, como as de feridas cutâneas; toxinoses, a exemplo da intoxicação alimentar estafilocócica decorrente da ingestão de enterotoxinas; e quadros sistêmicos de maior gravidade, incluindo síndrome da pele escaldada, síndrome do choque tóxico, endocardite, osteomielite, pneumonia, abscessos cerebrais, meningite e bacteremia (Oliveira; Borges; Simões, 2018).

As enterotoxinas estafilocócicas (SE) com atividade emética comprovada incluem: SEA-SEE, SEG-SEJ, SEL-SEQ e SER-SET. Essas toxinas apresentam elevada resistência ao calor e ao pH ácido, não sendo desnaturadas durante o cozimento de alimentos contaminados nem inativadas pelas enzimas proteolíticas do trato gastrointestinal, o que reforça sua relevância em surtos de intoxicação alimentar (Oliveira; Borges; Simões, 2018).

#### 2.6.4 *Escherichia coli*

No que se refere à bactéria *Escherichia coli*, trata-se de um bacilo Gram-negativo, anaeróbio facultativo, oxidase negativo e produtor de indol a partir do triptofano, sendo que aproximadamente 90% das cepas produzem  $\beta$ -glucuronidase (Heredia; Garcia, 2018), cujo seu habitat natural é o trato gastrointestinal de animais homeotérmicos, onde integra a microbiota intestinal (FDA, 2012). Embora a maioria das cepas de *E. coli* seja comensal e não patogênica, determinadas linhagens apresentam potencial para causar enfermidades diarreicas graves em humanos ou doenças extraintestinais (Heredia; Garcia, 2018).

A *Escherichia coli*, tem figurado como um dos principais agentes envolvido em

surtos alimentares no Brasil. O grupo DEC pode ser dividido em 7 patótipos de acordo com sua característica de patogenia, sendo eles enteropatogênico (EPEC), enterotoxigênico (ETEC), enteroinvasivo (EIEC), enterohemorrágico (EHEC), difusamente aderentes (DAEC), enteroagregativo (EAEC), uropatogênico (UPEC) e septicêmico (SEPEC) (BRASIL, 2019b; Castro *et al.*, 2019).

No Brasil, o sorotipo O157:H7 foi o mais frequentemente associado a casos humanos e apresentou as maiores taxas de ocorrência em animais, alimentos e humanos. Esse sorotipo faz parte do grupo patogênico EHEC, que produz uma toxina semelhante à shiga-toxina produzida pela *Shigella*, em que o indivíduo contaminado apresenta sinais clínicos que cursam com diarreia aquosa inicial a qual pode progredir em colite hemorrágica e síndrome hemolítica- urêmica (Batistella; Pedrosa, 2021).

A infecção por cepas patogênicas está frequentemente associada ao consumo de leite cru contaminado, constituindo importante causa de gastroenterites agudas, sobretudo em crianças (Vanetti, 2003). As manifestações clínicas variam conforme o patotipo envolvido, podendo abranger desde diarreia leve e autolimitada até colite hemorrágica com diarreia sanguinolenta intensa (Franco; Landgraf, 2013). Adicionalmente, elevadas contagens de *E. coli* em alimentos podem indicar risco potencial à saúde, sugerindo exposição a água não tratada, manipulação inadequada, contaminação pós-processamento ou falhas na higienização e sanitização de equipamentos (Marques *et al.*, 2007; Nascimento *et al.*, 2006).

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 Coleta de amostras

As amostras de 25 queijos Minas Frescal não inspecionados foram coletadas no período de junho a julho de 2026 em feiras livres nas regiões norte e leste do município de Uberlândia, Minas Gerais. Os queijos foram adquiridos na condição de consumidor às segundas e quintas-feiras, no período matutino, sendo identificados e mantidos em suas embalagens originais, e transportados em caixas isotérmicas contendo gelo reciclável até o Laboratório de Inspeção e Tecnologia de Produtos de Origem Animal (LITPOA) da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Federal de Uberlândia (UFU), onde foram realizadas as análises microbiológicas.

A seleção das feiras foi realizada por conveniência, considerando a disponibilidade dos locais para a coleta durante o período estabelecido e a comercialização do produto de interesse. Além disso, não foi possível assegurar, no momento da coleta, a origem da matéria-prima ou o emprego de leite pasteurizado em sua fabricação.

#### 3.2 Análise Microbiológica

Para a avaliação microbiológica das amostras, foram empregados métodos padronizados para análise de alimentos, com ênfase na detecção de *Salmonella* spp. (ISO, 2017). Inicialmente, sob condições assépticas, a bancada de trabalho e as embalagens fechadas dos queijos coletados foram descontaminadas previamente com álcool etílico a 70%. Após a descontaminação externa das embalagens, realizou-se a abertura individual e asséptica de cada amostra. Em seguida, foi retirada uma fração representativa de cada queijo, contemplando a porção interna e externa do produto. Essa fração foi obtida por meio do corte com o auxílio de uma espátula estéril, e posteriormente macerada com o mesmo instrumento. Em seguida, foram pesados 25 g da amostra e transferidos individualmente para frascos estéreis contendo 225 mL de Água Peptonada Tamponada (Buffered Peptone Water – BPW; CM0509, Oxoid®, Thermo Fisher Scientific, Waltham, EUA), na proporção de 1:10.

Na sequência, as amostras foram homogeneizadas por 60 segundos com auxílio de bastão de vidro estéril, e incubadas a 37 °C, por um período de 18 a 24

horas, correspondendo à etapa de pré-enriquecimento não seletivo. Após a incubação, cada amostra foi submetida às etapas subsequentes de enriquecimento seletivo, isolamento bacteriano e identificação bioquímica de *Salmonella* spp., culminando na confirmação molecular dos isolados por meio da reação em cadeia da polimerase (PCR) (ISO, 2017; Silva *et al.*, 2017), os quais serão descritos a seguir.

### 3.2.1 Identificação de *Salmonella* spp.

As amostras foram submetidas ao isolamento de *Salmonella* spp. de acordo com as diretrizes da ISO 6579-1. Após o período inicial de incubação em BPW, 0,1ml de cada amostra foi transferida para tubos contendo 10 mL de caldo Rappaport Vassilidis (RV), enquanto 1ml foi inoculado em tubos contendo 10ml de caldo Selenite Cystine (SC) para enriquecimento seletivo. Os tubos contendo caldo RV foram levados para banho-maria a  $45 \pm 0,5$  °C por 24 horas e os tubos de SC foram incubados em estufa bacteriológica a  $35 \pm 0,5$  °C por 24 horas.

Após o enriquecimento seletivo, uma alçada de cada caldo foi semeada por esgotamento, em placas contendo ágar Bismuto Sulfito (BS) (Oxoid) e Ágar Xilose, Lisina e Desoxicolato (XLD) (Oxoid), as quais foram incubadas a 37 °C por 24 horas. Em seguida, foram selecionadas colônias com características morfológicas sugestivas de *Salmonella* spp., sendo no ágar BS colônias negras ou verde-escuras, frequentemente acompanhadas de escurecimento do meio, e no ágar XLD colônias de coloração avermelhada com centro negro, decorrente da produção de sulfeto de hidrogênio (H<sub>2</sub>S).

As colônias suspeitas foram submetidas à identificação bioquímica por meio da inoculação em tubos de ensaio com ágar triplo açúcar e ferro (TSI) (Oxoid) e lisina e ferro (LIA) (Oxoid) e incubadas a 37 °C por 24 h. Foram consideradas suspeitas de *Salmonella* spp. as culturas que apresentaram perfil bioquímico compatível em pelo menos um dos meios. No ágar TSI, o perfil típico foi caracterizado por reação alcalina no bisel (vermelho) e reação ácida no fundo (amarelo), associadas à produção de sulfeto de hidrogênio (H<sub>2</sub>S), evidenciada pelo escurecimento do meio, com ou sem produção de gás. No ágar LIA, foram consideradas típicas as culturas que apresentaram descarboxilação da lisina, caracterizada pela coloração púrpura do meio, associada ou não à produção de H<sub>2</sub>S.

Os isolados com perfil bioquímico sugestivo foram preservados em caldo Brain

Heart Infusion (BHI), suplementado com 10% de glicerol, e armazenados a  $-20^{\circ}\text{C}$  até a realização da confirmação molecular por reação em cadeia da polimerase (PCR).

### 3.2.2 Confirmação molecular de *Salmonella* spp.- Genes *ompC* e *invA*

A extração do DNA bacteriano foi realizada pelo método de fervura, conforme descrito por De Medici *et al.* (2003). Posteriormente, procedeu-se à confirmação molecular dos isolados por meio da amplificação dos genes *ompC* e *invA*, empregados como marcadores complementares para a identificação de *Salmonella* spp.

A amplificação do gene *ompC* foi realizada de acordo com o protocolo descrito por Alvarez *et al.* (2004), com modificações. As reações foram preparadas em volume final de 16  $\mu\text{L}$ , contendo 2  $\mu\text{L}$  de DNA molde, 8  $\mu\text{L}$  de GoTaq® Green Master Mix (Promega, Madison, WI, EUA), 4,8  $\mu\text{L}$  de água livre de nucleases e 0,6  $\mu\text{L}$  de cada primer: *ompC*-F (5'-ATCGCTGACTTATGCAATCG-3') e *ompC*-R (5'-CGGGTTGCGTTATAGGTCTG-3'). O tamanho esperado do produto amplificado foi de 204 pares de bases (pb). As condições de amplificação consistiram em desnaturação inicial a  $95^{\circ}\text{C}$  por 2 minutos, seguida de 30 ciclos de desnaturação a  $95^{\circ}\text{C}$  por 1 minuto, anelamento a  $57^{\circ}\text{C}$  por 1 minuto e extensão a  $72^{\circ}\text{C}$  por 2 minutos, com extensão final a  $72^{\circ}\text{C}$  por 5 minutos.

A amplificação do gene *invA* foi realizada conforme o protocolo descrito por Oliveira *et al.* (2003), com modificações. As reações foram preparadas em volume final de 16  $\mu\text{L}$ , contendo 2  $\mu\text{L}$  de DNA molde, 8  $\mu\text{L}$  de GoTaq® Green Master Mix (Promega, Madison, WI, EUA), 4,8  $\mu\text{L}$  de água livre de nucleases e 0,6  $\mu\text{L}$  de cada primer: *invA*-F (5'-GTGAAATTATCGCCACGTTCTGGGCAA-3') e *invA*-R (5'-TCATCGCACCGTCAAAGGAACC-3'). O produto esperado foi de 284 pb. As condições de amplificação compreenderam desnaturação inicial a  $95^{\circ}\text{C}$  por 5 minutos, seguida de 30 ciclos de desnaturação a  $95^{\circ}\text{C}$  por 20 segundos, anelamento a  $58^{\circ}\text{C}$  por 20 segundos e extensão a  $72^{\circ}\text{C}$  por 30 segundos, finalizando com extensão a  $72^{\circ}\text{C}$  por 7 minutos.

Em todas as reações foram incluídos controles positivos para os genes *ompC* e *invA*, além de um controle negativo. Os produtos da PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 1,5% (p/v), corado com UniSafe® (Uniscience, Osasco, SP, Brasil), conforme metodologia descrita por Aranda *et al.* (2007). Os fragmentos amplificados foram visualizados sob luz ultravioleta e analisados por

comparação com um marcador de peso molecular de 100 pb (Promega). Após a confirmação molecular, os resultados foram expressos como presença ou ausência de *Salmonella* spp. em 25 g de cada amostra. Foram considerados isolados positivos para *Salmonella*, aqueles em que se identificou pelo menos um dos dois genes pesquisados.

### **3.3 Análise de dados**

A frequência de positividade para *Salmonella* spp. foi comparada de forma descritiva em comparação à legislação vigente (RDC nº 724/2022 e IN nº 161/2022) no país. Além disso, a positividade também foi comparada entre os dias de coleta das amostras (segunda e quinta-feira), sendo essa análise feita através do teste exato de Fisher, com nível de significância de 5% ( $p < 0,05$ ).

#### 4 RESULTADOS

Os resultados referentes à detecção de *Salmonella* spp. nas amostras de Queijo Minas Frescal comercializados em feiras livres no município de Uberlândia (MG) estão apresentados na Tabela 1. Das 25 amostras analisadas, 13 apresentaram presença de *Salmonella* spp., representando uma taxa de positividade de 52%.

**Tabela 1:** Percentual de amostras de Queijo Minas Frescal positivas para *Salmonella* spp. comercializados em feiras livres de Uberlândia-MG

| Amostra              | n  | <i>Salmonella</i> spp. |    |
|----------------------|----|------------------------|----|
|                      |    | +                      | %  |
| Queijo Minas Frescal | 25 | 13                     | 52 |

A partir do processamento das 25 amostras de Queijo Minas Frescal, foram obtidos 20 isolados bacterianos. A confirmação molecular do gênero *Salmonella* foi realizada por meio da reação em cadeia da polimerase (PCR), direcionada aos genes alvos *ompC* e *invA*. Como detalhado na Tabela 2, todos os 20 isolados amplificaram ao menos um dos alvos genéticos analisados: 2 isolados apresentaram amplificação exclusiva para o gene *ompC*, 6 demonstraram detecção isolada do gene *invA*, e 12 exibiram a presença simultânea de ambos os genes (*ompC* + *invA*).

**Tabela 2:** Caracterização molecular dos isolados de *Salmonella* spp. por detecção dos genes *ompC* e *invA* utilizados para a confirmação, obtidos de Queijo Minas Frescal comercializados em feiras livres de Uberlândia-MG.

| Amostra              | N  | <i>Salmonella</i> spp. |             |                  |
|----------------------|----|------------------------|-------------|------------------|
|                      |    | <i>ompC</i>            | <i>invA</i> | <i>ompC+invA</i> |
| Queijo Minas Frescal | 25 | 2                      | 6           | 12               |

A avaliação da contaminação em função do dia de amostragem revelou diferença estatisticamente significativa na frequência de contaminação por *Salmonella* spp. entre os Queijos Minas Frescal coletados às segundas-feiras e às quintas-feiras ( $p=0,414$ ). Como discriminado na Tabela 3, os queijos adquiridos às segundas-feiras apresentaram uma taxa de positividade superior (68,75%; N = 11/16) em comparação aos coletados às quintas-feiras (22,22%; N = 2/9).

**Tabela 3:** Frequência de detecção de *Salmonella* spp. em Queijos Minas Frescal comercializados em feiras livres de Uberlândia-MG, conforme o dia da coleta.

| Dia da Coleta | N  | <i>Salmonella</i> spp. |       | Valor de P |
|---------------|----|------------------------|-------|------------|
|               |    | +                      | %     |            |
| Segunda-feira | 16 | 11                     | 68,75 | 0,0414     |
| Quinta-feira  | 9  | 2                      | 22,22 |            |

Além disso, a análise complementar da razão de chances (Odds Ratio- OR) indicou que as amostras comercializadas às segundas-feiras apresentaram 7,70 vezes mais chances de terem presença de *Salmonella* spp. do que aquelas obtidas às quintas-feiras (OR = 7,70, IC = 1,129 – 42,83). Apesar do amplo intervalo de confiança (IC), provavelmente decorrente do reduzido tamanho amostral, o limite inferior superior a 1 reforça a existência de associação estatisticamente significativa entre as variáveis analisadas.

## 5 DISCUSSÃO

A detecção de *Salmonella* spp. em 52% (13/25) das amostras de Queijo Minas Frescal não inspecionados comercializadas em feiras livres do município de Uberlândia-MG evidenciou elevada ocorrência desse patógeno e demonstrou que mais da metade dos produtos analisados estavam em desacordo com os padrões microbiológicos estabelecidos pela legislação. Conforme estabelecido pela Resolução RDC nº 724/2022 e a Instrução Normativa nº 161/2022, os queijos de alta umidade devem apresentar ausência de *Salmonella* spp. em 25 gramas de alimento. Dessa forma, as amostras positivas observadas neste estudo são consideradas impróprias para consumo, uma vez que a presença desse microrganismo representa risco potencial à saúde pública (Brasil, 2022a, 2022b).

A frequência de contaminação observada neste estudo foi superior à descrita em parte das pesquisas realizadas com Queijo Minas Frescal no Brasil. Em estudo conduzido por Oliveira *et al.* (2021), ao avaliarem queijos Minas Frescal clandestinos comercializados no município de Araguaína, Tocantins, não foi detectada a presença de *Salmonella* spp. em nenhuma das amostras analisadas. Resultados semelhantes foram descritos por Do Carmo *et al.* (2022), que, ao investigarem amostras de Queijo Minas Frescal comercializadas na feira livre do município de Pedro Leopoldo, Minas Gerais, também verificaram a ausência desse patógeno. A divergência entre esses achados e os resultados obtidos na presente pesquisa sugere diferenças nas condições higiênico-sanitárias adotadas ao longo da cadeia produtiva e de comercialização, fatores que exercem influência direta sobre a segurança microbiológica do produto (Oliveira *et al.*, 2021; Do Carmo *et al.*, 2022).

Por outro lado, Lima e Cardoso (2019) relataram outro cenário ao avaliarem Queijos Minas Frescal comercializados em feiras livres do Distrito Federal, constatando a presença de *Salmonella* spp. em 95% das amostras analisadas, percentual superior ao observado nesta pesquisa. A variação observada entre os estudos evidencia que a ocorrência de *Salmonella* spp. em Queijo Minas Frescal pode diferir consideravelmente entre regiões e sistemas de comercialização. Essas diferenças estão relacionadas a fatores como as condições de higiene durante a ordenha e o processamento, a adoção das Boas Práticas de Fabricação, a eficiência da cadeia de refrigeração durante o transporte e armazenamento, o tempo de exposição dos produtos durante a comercialização, bem como às diferenças

metodológicas, incluindo o número de amostras e os métodos de detecção empregados em cada investigação (Oliveira et al., 2021; Ferreira, Silva, 2021; Do Carmo et al., 2022; Lima; Cardoso, 2019).

A avaliação da contaminação em função do dia da coleta evidenciou associação estatisticamente significativa entre as amostras adquiridas às segundas-feiras e às quintas-feiras ( $p = 0,0414$ ). Além disso, os queijos coletados às segundas-feiras apresentaram 7,70 vezes mais chances de estarem contaminados por *Salmonella* spp. quando comparados aos comercializados às quintas-feiras (OR = 7,70; IC95%: 1,129–42,83). Esses resultados sugerem que fatores relacionados ao armazenamento, transporte e tempo de exposição durante a comercialização podem ter contribuído para a maior frequência de contaminação observada nas amostras coletadas às segundas-feiras.

Nesse contexto, de acordo com Piza *et al.* (2024), as falhas na manutenção da cadeia de refrigeração, exposição prolongada dos queijos à temperatura ambiente, manipulação excessiva e ausência de inspeção sanitária comprometem a qualidade microbiológica do produto. De maneira semelhante, Silva e Costa (2021) observaram que inadequações nas condições de conservação e higiene durante a comercialização em feiras livres favorecem a contaminação por microrganismos patogênicos. Entretanto, embora esses fatores sejam apontados como potenciais determinantes da contaminação microbiológica, estudos complementares são necessários para identificar, de forma precisa, quais etapas da cadeia produtiva e de comercialização contribuem para esse resultado.

A confirmação molecular dos 20 isolados de *Salmonella* spp. obtidos por meio da detecção dos genes *ompC* e *invA* reforçou a confiabilidade da identificação microbiológica realizada. Entre os isolados obtidos, 12 apresentaram amplificação simultânea de ambos os genes, seis apresentaram apenas o gene *invA* e dois apenas o gene *ompC*. Estudos de Rahn *et al.* (1992) e Alvarez *et al.* (2004) demonstram a elevada especificidade e sensibilidade desses marcadores em protocolos de PCR para identificação de *Salmonella*.

O gene *ompC* codifica uma proteína de membrana externa altamente conservada, utilizada como marcador para confirmação do gênero *Salmonella*, enquanto o *invA* está relacionado ao processo de invasão das células epiteliais intestinais, e é considerado um importante marcador de virulência. Dessa forma, a elevada frequência de detecção de *ompC* e *invA* observada neste estudo indica que

grande parte dos isolados apresenta potencial patogênico, constituindo importante material para futuras investigações envolvendo sorotipagem, caracterização genotípica e perfil de resistência aos antimicrobianos (Galán *et al.*, 1992; Rahn *et al.*, 1992; Alvarez *et al.*, 2004).

## **6 CONCLUSÃO**

Os resultados deste estudo demonstraram elevada ocorrência de *Salmonella* spp. em Queijos Minas Frescal não inspecionados comercializados em feiras livres de Uberlândia-MG, com 52% das amostras em desacordo com os padrões microbiológicos estabelecidos pela legislação vigente. A confirmação molecular dos isolados por meio dos genes *ompC* e *invA* reforçou a confiabilidade da identificação e evidenciou o potencial patogênico das cepas. Esses resultados evidenciam a necessidade de fortalecer as ações de inspeção sanitária, a adoção das Boas Práticas de Fabricação, visando garantir a segurança microbiológica do produto e reduzir os riscos à saúde pública.

## REFERÊNCIAS

ALMEIDA, R. **Surtos por *Salmonella*: dados estatísticos, sintomas e prevenção.** *Food Safety Brazil*, 2015. Disponível em: <https://foodsafetybrazil.org>. Acesso em: 13 mai. 2026.

ALVAREZ, J.; SOTA, M.; VIVANCO, A. B.; PERALES, I.; CISTERNA, R.; REMENTERIA, A.; GARAIZAR, J. **Development of a multiplex PCR technique for detection and epidemiological typing of *Salmonella* in human clinical samples.** *Journal of Clinical Microbiology*, Washington, DC, v. 42, n. 4, p. 1734-1738, 2004. DOI: <https://doi.org/10.1128/JCM.42.4.1734-1738.2004>.

ALVES, V. S.; COSTA, P. S.; ROBBS, P. G.; FAVARIN, V. **Avaliação tecnológica sobre a produção artesanal de queijo Minas Frescal utilizando glucona-delta-lactona (GDL) e sua importância para *Staphylococcus aureus*.** *Higiene Alimentar*, São Paulo, v. 17, n. 107, p. 27-31, 2003.

AMARAL, J. W.; SOUZA, S. M. O.; RIBEIRO, J. L.; FERREIRA, M. A.; POGGIANI, S. S. C. **Avaliação da qualidade de queijos de produção informal.** *Segurança Alimentar e Nutricional*, Campinas, v. 27, e020016, 2020. DOI: <https://doi.org/10.20396/san.v27i0.8657464>.

AMORIM, A. L. B. C. *et al.* **Comercialização informal de produtos de origem animal: aspectos higiênico-sanitários e percepção dos consumidores.** *Higiene Alimentar*, São Paulo, 2014.

ARANDA, K. R. S.; FAGUNDES-NETO, U.; SCALETSKY, I. C. A. *et al.* **One-day multiplex PCR-based method for the rapid identification of all six categories of diarrheagenic *Escherichia coli*.** *Journal of Clinical Microbiology*, Washington, DC, v. 45, n. 8, p. 2662-2665, 2007. DOI: <https://doi.org/10.1128/JCM.00570-07>.

ARAÚJO, J. P. A. *et al.* **Uma análise histórico-crítica sobre o desenvolvimento das normas brasileiras relacionadas a queijos artesanais.** *Arquivo Brasileiro de*

*Medicina Veterinária e Zootecnia*, Belo Horizonte, v. 72, n. 5, p. 1845-1860, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1590/1678-4162-11858>.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DA INDÚSTRIA DE LÁCTEOS LONGA VIDA (ABLV). **Relatório anual 2024**. São Paulo: ABLV, 2025. Disponível em: <https://ablv.org.br/wp-content/uploads/2025/07/ABLV-Relatorio-Anual-2024s.pdf>. Acesso em: 21 jun. 2026.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DAS INDÚSTRIAS DE QUEIJO (ABIQ). **Queijo Minas Frescal**. São Paulo: ABIQ, 2024. Disponível em: <https://abiq.com.br/queijo-e-suas-caracteristicas/queijos-fabricados-no-brasil/queijos-de-leite-de-vaca/minas-frescal/>. Acesso em: 12 abr. 2026.

BATISTELLA, V. M. C.; PEDROSA, A. **Qualidade microbiológica de queijos Minas Frescal artesanais**. *Scientific Electronic Archives*, Sinop, v. 13, n. 5, p. 99-103, 2021.

BOMBACHI, R. *et al.* **Influence of ripening and moisture on the microbiological quality of Minas Artisanal Cheese**. *Food Bioscience*, v. 60, p. 104364, 2024. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2024.104364>.

BONASSI, I. A.; GOLDONI, J. S.; LIMA, V. A. **Efeito da acidificação direta com ácido láctico na fabricação do queijo Minas Frescal**. *Revista Brasileira de Tecnologia*, Rio de Janeiro, v. 9, p. 73-74, 1980.

BRASIL. **Lei nº 1.283, de 18 de dezembro de 1950**. Dispõe sobre a inspeção industrial e sanitária dos produtos de origem animal. *Diário Oficial da União: seção 1*, Brasília, DF, 19 dez. 1950.

BRASIL. **Decreto nº 30.691, de 29 de março de 1952**. Aprova o novo Regulamento da Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal. *Diário Oficial da União: seção 1*, Brasília, DF, 7 jul. 1952.

BRASIL. **Lei nº 7.889, de 23 de novembro de 1989**. Dispõe sobre a inspeção sanitária

e industrial dos produtos de origem animal. *Diário Oficial da União: seção 1*, Brasília, DF, 24 nov. 1989.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Portaria nº 146, de 7 de março de 1996**. Aprova os Regulamentos Técnicos de Identidade e Qualidade dos Produtos Lácteos. *Diário Oficial da União: seção 1*, Brasília, DF, 11 mar. 1996.

BRASIL. Ministério da Agricultura e do Abastecimento. **Portaria nº 352, de 4 de setembro de 1997**. Aprova o Regulamento Técnico para Fixação de Identidade e Qualidade de Queijo Minas Frescal. *Diário Oficial da União: seção 1*, Brasília, DF, 8 set. 1997.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Resolução RDC nº 21, de 26 de janeiro de 2001**. Aprova o Regulamento Técnico para Irradiação de Alimentos. *Diário Oficial da União: seção 1*, Brasília, DF, 29 jan. 2001.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Resolução RDC nº 275, de 21 de outubro de 2002**. Dispõe sobre o Regulamento Técnico de Procedimentos Operacionais Padronizados aplicados aos estabelecimentos produtores/industrializadores de alimentos e a lista de verificação das Boas Práticas de Fabricação. *Diário Oficial da União: seção 1*, Brasília, DF, 23 out. 2002.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Instrução Normativa nº 4, de 23 de fevereiro de 2004**. Altera o Regulamento Técnico para Fixação de Identidade e Qualidade do Queijo Minas Frescal. *Diário Oficial da União: seção 1*, Brasília, DF, 5 mar. 2004.

BRASIL. **Decreto nº 5.741, de 30 de março de 2006**. Regulamenta os arts. 27-A, 28-A e 29-A da Lei nº 8.171, de 17 de janeiro de 1991, organiza o Sistema Unificado de Atenção à Sanidade Agropecuária e dá outras providências. *Diário Oficial da União: seção 1*, Brasília, DF, 31 mar. 2006.

BRASIL. **Decreto nº 9.013, de 29 de março de 2017**. Regulamenta a Lei nº 1.283, de

18 de dezembro de 1950, e a Lei nº 7.889, de 23 de novembro de 1989, que dispõem sobre a inspeção industrial e sanitária de produtos de origem animal. *Diário Oficial da União: seção 1*, Brasília, DF, 30 mar. 2017.

BRASIL. **Lei nº 13.680, de 14 de junho de 2018**. Altera a Lei nº 1.283, de 18 de dezembro de 1950, para dispor sobre o processo de fiscalização de produtos alimentícios de origem animal produzidos de forma artesanal. *Diário Oficial da União: seção 1*, Brasília, DF, 15 jun. 2018.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Resolução RDC nº 331, de 23 de dezembro de 2019**. Dispõe sobre os padrões microbiológicos de alimentos e sua aplicação. *Diário Oficial da União: seção 1*, Brasília, DF, 26 dez. 2019a. Disponível em: <https://www.in.gov.br/en/web/dou/-/resolucao-rdc-n-331-de-23-de-dezembro-de-2019-235332272>. Acesso em: 15 mai. 2026.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Instrução Normativa nº 60, de 23 de dezembro de 2019**. Estabelece as listas de padrões microbiológicos para alimentos. *Diário Oficial da União: seção 1*, Brasília, DF, 26 dez. 2019b. Disponível em: <https://www.in.gov.br/en/web/dou/-/instrucao-normativa-n-60-de-23-de-dezembro-de-2019-235332356>. Acesso em: 15 mai. 2026.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Doenças transmitidas por alimentos: manual integrado de vigilância, prevenção e controle**. Brasília, DF: Ministério da Saúde, 2019c.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Boletim epidemiológico: surtos de doenças transmitidas por alimentos no Brasil, 2016-2019**. Brasília, DF: Ministério da Saúde, 2020.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Surtos de doenças transmitidas por alimentos no Brasil: definição e orientações gerais**. Brasília, DF: Ministério da Saúde, 2021.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Resolução RDC nº 724, de 1º de**

**julho de 2022.** Dispõe sobre os padrões microbiológicos dos alimentos e sua aplicação. *Diário Oficial da União: seção 1*, Brasília, DF, 6 jul. 2022a.

Disponível em: <https://www.in.gov.br/en/web/dou/-/resolucao-rdc-n-724-de-1-de-julho-de-2022-413366143>. Acesso em: 15 mai. 2026.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Instrução Normativa nº 161, de 1º de julho de 2022.** Estabelece os padrões microbiológicos dos alimentos. *Diário Oficial da União: seção 1*, Brasília, DF, 6 jul. 2022b.

Disponível em: <https://www.in.gov.br/en/web/dou/-/instrucao-normativa-in-n-161-de-1-de-julho-de-2022-413366524>. Acesso em: 15 mai. 2026.

BRASIL. Ministério da Saúde e Ambiente. Secretaria de Vigilância em Saúde e Ambiente. **Informe epidemiológico 2024: surtos de doenças de transmissão hídrica e alimentar no Brasil, 2014-2023.** Brasília, DF: Ministério da Saúde e Ambiente, 2024.

BUCHANAN, R. L. *et al.* **A review of *Listeria monocytogenes*: outbreaks, virulence and risk assessment.** *Food Control*, v. 75, p. 1-13, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2016.12.016>.

CAMARGO, A. C. *et al.* **Microbiological quality and safety of Brazilian artisanal cheeses.** *Brazilian Journal of Microbiology*, São Paulo, v. 52, n. 1, p. 393-409, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1007/s42770-020-00425-9>.

CASTRO, V. S. *et al.* **Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in Brazil: a systematic review.** *Microorganisms*, Basel, v. 7, n. 5, p. 137, 2019. DOI: <https://doi.org/10.3390/microorganisms7050137>.

COELHO, K. S. *et al.* **Influência da qualidade do leite cru refrigerado no processamento, rendimento e qualidade do queijo Minas Frescal.** *Revista Brasileira de Tecnologia Agroindustrial*, Ponta Grossa, v. 15, n. 2, 2021. DOI: <https://doi.org/10.3895/rbta.v15n2.13616>.

D'AMICO, D. J. **Microbiological quality and safety issues in cheesemaking.**

*Microbiology Spectrum*, Washington, DC, v. 2, n. 1, p. 251-309, 2014. DOI: <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.CM-0011-2012>.

DE MEDICI, D. *et al.* **Evaluation of DNA extraction methods for use in combination with SYBR Green I real-time PCR to detect *Salmonella enterica* serotype Enteritidis in poultry.** *Applied and Environmental Microbiology*, Washington, DC, v. 69, n. 6, p. 3456-3461, 2003. DOI: <https://doi.org/10.1128/AEM.69.6.3456-3461.2003>.

DIAS, J. C. **Uma longa e deliciosa viagem: o primeiro livro da história do queijo no Brasil.** São Paulo: Barleus, 2010.

DO CARMO, D. L.; SANTOS, G. P.; SILVEIRA, T. M. L.; DELVIVO, F. M.; AMORIM, M. M. A.; LIMA, A. R. **Análise microbiológica de queijos Minas Frescal comercializados na feira livre do município de Pedro Leopoldo, Minas Gerais.** *Conjecturas*, São Paulo, v. 22, n. 7, p. 339-349, 2022.  
Disponível em: <https://conjecturas.org/index.php/edicoes/article/view/1074>. Acesso em: 11 mai. 2026. DOI: <https://doi.org/10.53660/CONJ-1074-2R38>.

FDA (UNITED STATES FOOD AND DRUG ADMINISTRATION). **Bad Bug Book: foodborne pathogenic microorganisms and natural toxins handbook.** 2. ed. Silver Spring: FDA, 2012. Disponível em: <https://www.fda.gov/food/foodborne-pathogens/bad-bug-book-second-edition>. Acesso em: 21 mar. 2026.

FERREIRA, A. C. M.; SILVA, H. A. **Indicadores higiênico-sanitários em queijos do tipo Minas Frescal na cidade de Uberlândia-MG.** *Revista Brasileira Multidisciplinar*, Araraquara, v. 24, n. 1, p. 103-111, 2021. DOI: <https://doi.org/10.25061/2527-2675/ReBraM/2021.v24i1.891>.

FERREIRA, S. M. *et al.* **Condições higiênico-sanitárias de feiras livres: avaliação dos manipuladores de alimentos.** *Higiene Alimentar*, São Paulo, 2011.

FRANCO, B. D. G. M.; LANDGRAF, M. **Microbiologia dos alimentos.** São Paulo: Atheneu, 2013.

FURTADO, M. M. *et al.* **O rendimento na fabricação de queijos: métodos para avaliação e comparação. Parte 2.** São Paulo: Há-la Biotec, 1998.

GALÁN, J. E.; GINOCCHIO, C.; COSTEAS, P. **Molecular and functional characterization of the *Salmonella* invasion gene *invA*: homology of InvA to members of a new protein family.** *Journal of Bacteriology*, Washington, DC, v. 174, n. 13, p. 4338-4349, 1992. DOI: <https://doi.org/10.1128/jb.174.13.4338-4349.1992>.

GARCIA, S. N. *et al.* **Consumo de alimentos de origem animal comercializados informalmente: fatores associados e percepção dos consumidores.** *Revista do Instituto Adolfo Lutz*, São Paulo, 2016.

GONZALES-BARRON, U. *et al.* **Behavior of *Listeria monocytogenes* in the presence or not of intentionally added lactic acid bacteria during ripening of artisanal Minas semi-hard cheese.** *International Journal of Food Microbiology*, Amsterdam, v. 91, p. 103545, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2020.103545>.

HEREDIA, N.; GARCÍA, S. **Animals as sources of food-borne pathogens: a review.** *Animal Nutrition*, Amsterdam, v. 4, n. 3, p. 250-255, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.aninu.2018.04.006>.

INSTITUTO DO PATRIMÔNIO HISTÓRICO E ARTÍSTICO NACIONAL (IPHAN). **Modo artesanal de fazer queijo de Minas nas regiões do Serro, Serra da Canastra e Serra do Salitre (Alto Paranaíba).** Brasília, DF: IPHAN, 2008. (Dossiê de Registro).

INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION. **ISO 6579-1:2017: Microbiology of the food chain — Horizontal method for the detection, enumeration and serotyping of *Salmonella* — Part 1: Detection of *Salmonella* spp.** Geneva: ISO, 2017.

JAY, J. M. **Microbiologia de alimentos.** 6. ed. Porto Alegre: Artmed, 2005.

LIMA, M. S.; PENNA, L. P. C. **Fabricação de produtos lácteos: princípios básicos**. Belo Horizonte: Emater-MG, 2012.

LIMA, A. A.; CARDOSO, A. J. V. S. **Qualidade microbiológica de queijo Minas Frescal artesanal comercializado em feiras livres do Distrito Federal**. *Brazilian Journal of Development*, São José dos Pinhais, v. 5, n. 9, p. 13673-13688, 2019. DOI: <https://doi.org/10.34117/bjdv5n9-005>

LIMA, M. A. C.; PAGANOTO, F. S.; PINTO, E. V. **O desafio do comerciante na higienização alimentar em feiras livres brasileiras: uma análise dos fatores críticos**. *Revista Ibero-Americana de Humanidades, Ciências e Educação*, São Paulo, v. 12, n. 7, 2026. DOI: <https://doi.org/10.51891/rease.v12i7.28751>.

LIMA, T. T. M. *et al.* **Projeto Queijo+ Forte: plano de atendimento a produtores de queijos artesanais no contexto da pandemia de Covid-19**. *Revista Brasileira de Extensão Universitária*, Chapecó, v. 14, n. 3, p. 223-240, 2023. DOI: <https://doi.org/10.36661/2358-0399.2023v14i3.13461>

MARQUES, F. C.; MENASCHE, R.; TONEZER, C.; GENESSINI, A. **Circulação de alimentos: dádiva, sociabilidade e identidade**. In: MENASCHE, R. (org.). **A agricultura familiar à mesa: saberes e práticas da alimentação no Vale do Taquari**. Porto Alegre: Ed. UFRGS, 2007. p. 154-171. Disponível em: <http://guaiaca.ufpel.edu.br/handle/prefix/6368>. Acesso em: 16 abr. 2026.

MATOS, J. C.; BENVINDO, L. R. S.; SILVA, T. O.; CARVALHO, L. M. F. **Condições higiênico-sanitárias de feiras livres: uma revisão integrativa**. *Revista Eletrônica Gestão & Saúde*, Brasília, DF, v. 6, n. 3, p. 2884-2893, 2015.

MELO, A. C. A.; SILVA, E. L. **Queijo Minas Artesanal: patrimônio brasileiro proibido e oportunidade para o desenvolvimento do turismo rural em Serro/MG**. In: **FÓRUM INTERNACIONAL DE TURISMO DO IGUAÇU**, 8., 2014, Foz do Iguaçu. **Anais...** Foz do Iguaçu: FIT Iguaçu, 2014.

MINAS GERAIS. **Lei nº 14.185, de 31 de janeiro de 2002.** Dispõe sobre o processo de produção do Queijo Minas Artesanal. *Diário Oficial do Estado de Minas Gerais*, Belo Horizonte, 1 fev. 2002.

MINAS GERAIS. Instituto Mineiro de Agropecuária. **Portaria IMA nº 2.033, de 23 de janeiro de 2021.** Estabelece normas complementares para a produção e comercialização do Queijo Minas Artesanal no Estado de Minas Gerais. *Diário do Executivo do Estado de Minas Gerais*, Belo Horizonte, 26 jan. 2021.

MINAS GERAIS. Secretaria de Estado de Saúde. **Secretaria de Saúde orienta população sobre prevenção de doenças diarreicas e infecções transmitidas por água e alimentos.** Belo Horizonte, 25 jul. 2025. Disponível em: <https://www.saude.mg.gov.br>. Acesso em: 21 mar. 2026.

NASCIMENTO, A. R. *et al.* **Perfil microbiológico do caldo de cana comercializado na cidade de São Luís, MA.** *Higiene Alimentar*, São Paulo, v. 20, n. 141, p. 83-86, 2006.

NERO, L. A. *et al.* **Listeria monocytogenes and Salmonella spp. in raw milk produced in Brazil.** *Zoonoses and Public Health*, Berlin, v. 55, n. 6, p. 299-305, 2008. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1863-2378.2008.01122.x>.

OLIVEIRA, D.; BORGES, A.; SIMÕES, M. **Staphylococcus aureus toxins and their molecular activity in infectious diseases.** *Toxins*, Basel, v. 10, n. 6, p. 252, 2018. DOI: <https://doi.org/10.3390/toxins10060252>.

OLIVEIRA, J. S. **Queijos: fundamentos tecnológicos.** Campinas: Ícone; UNICAMP, 1986.

OLIVEIRA, M. S.; SANTOS, I. G. C.; DIAS, B. P.; NASCIMENTO, C. A.; RODRIGUES, E. M.; RODRIGUES JÚNIOR, J. C.; ALFIERI, A. A.; ALEXANDRINO, B. **Hygienic-health quality and microbiological hazard of clandestine Minas Frescal cheese commercialized in North Tocantins, Brazil.** *Semina: Ciências Agrárias*, Londrina, v. 42, n. 2, p. 679-694, 2021. DOI:

<https://doi.org/10.5433/1679-0359.2021v42n2p679>.

OLIVEIRA, S. D. *et al.* **Detection of *Salmonella* in chicken carcasses by multiplex PCR.** *Research in Microbiology*, Paris, v. 154, n. 6, p. 399-403, 2003. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0923-2508\(03\)00128-8](https://doi.org/10.1016/S0923-2508(03)00128-8).

PAULA, J. C. J.; CARVALHO, A. F.; FURTADO, M. M. **Princípios básicos de fabricação de queijo: do histórico à salga.** *Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes*, Juiz de Fora, v. 64, n. 367/368, p. 19-25, 2009.

PAULA, J. C. J. **Queijo Minas Frescal.** In: **Compêndio de tecnologia de lácteos.** Juiz de Fora: EPAMIG/ILCT, 2018. p. 125-148.

PERRY, K. S. P. **Queijos: aspectos químicos, bioquímicos e microbiológicos.** *Química Nova*, São Paulo, v. 27, n. 2, p. 293-300, 2004. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0100-40422004000200020>.

PIZA, L. V. *et al.* **Qualidade microbiológica de queijo Minas Frescal comercializado informalmente: revisão sistemática.** *Observatorio de la Economía Latinoamericana*, v. 21, 2023.

PIZA, M. L. S. T.; SMANIOTTO, B. D.; LIONETE, T. A.; MATONO, D. **Qualidade microbiológica de queijos Minas Frescal não inspecionados comercializados em feiras livres na região de Bauru, São Paulo.** *Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes*, Juiz de Fora, v. 78, n. 3, p. 85-92, 2024. DOI: <https://doi.org/10.14295/2238-6416.v78i3.945>.

RAHN, K. *et al.* **Amplification of an *invA* gene sequence of *Salmonella typhimurium* by polymerase chain reaction as a specific method of detection of *Salmonella*.** *Molecular and Cellular Probes*, London, v. 6, n. 4, p. 271-279, 1992. DOI: [https://doi.org/10.1016/0890-8508\(92\)90002-F](https://doi.org/10.1016/0890-8508(92)90002-F).

SANTOS, A. R. A. *et al.* **Associations among production systems and microbiological results of Minas Artisanal Cheese.** *Food Control*, v. 171, p. 111112,

2025. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2024.111112>

SENAR. **Queijos: produção de derivados do leite**. 2. ed. Brasília, DF: SENAR, 2010.

SILVA, F. T. **Queijo Minas Frescal**. Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológica, 2005.

SILVA, L. N. R.; COSTA, M. R. **Condições de comercialização e qualidade de queijos Minas Frescal em feiras livres e mercado municipal de Campo Grande, MS**. *Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes*, Juiz de Fora, v. 75, n. 4, p. 285-296, 2021. DOI: <https://doi.org/10.14295/2238-6416.v75i4.806>.

SILVA, N.; JUNQUEIRA, V. C. A.; SILVEIRA, N. F. A.; TANIWAKI, M. H.; GOMES, R. A. R.; OKAZAKI, M. M. **Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos e água**. 5. ed. São Paulo: Blucher, 2017.

SILVA, T. E. *et al.* **Shelf life study of handmade and industrially processed Minas Frescal cheese**. *Nutrition & Food Science*, v. 49, n. 6, p. 1207-1218, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1108/NFS-02-2019-0055>.

SILVA, T. M.; SANTOS, A. S. dos; TEOTONIO, E. P. S. da S. **Alimentos comercializados em feiras livres contaminados por patógenos**. *Atas de Ciências da Saúde*, São Paulo, v. 11, n. 2, 2023. DOI: <https://doi.org/10.37885/231014818>

SOUZA, I. A. *et al.* **Qualidade microbiológica de queijo Minas Frescal comercializado na Zona da Mata Mineira**. *Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes*, Juiz de Fora, v. 72, n. 3, p. 152-162, 2017. DOI: <https://doi.org/10.14295/2238-6416.v72i3.603>

TRABULSI, L. R.; ALTERTHUM, F. **Microbiologia**. 6. ed. São Paulo: Atheneu, 2016.

VANETTI, M. C. D. **Microrganismos patogênicos em leite**. In: MENDONÇA, R. C. S. (org.). **Microbiologia de alimentos: qualidade e segurança na produção e consumo**. Viçosa: Tribuna, 2003. p. 49-56.