



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO SEMI-ÁRIDO
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL
MESTRADO EM CIÊNCIA ANIMAL

NATÁLIA CRISTINA DE MEDEIROS

**QUALIDADE DO LEITE UTILIZADO EM QUEIJARIAS ARTESANAIS NO RIO
GRANDE DO NORTE**

MOSSORÓ - RN
2017

NATÁLIA CRISTINA DE MEDEIROS

**QUALIDADE DO LEITE UTILIZADO EM QUEIJARIAS ARTESANAIS NO RIO
GRANDE DO NORTE**

Dissertação apresentada à Universidade Federal Rural do Semi-Árido (UFERSA), como exigência final para obtenção do título de Mestre no curso de Pós-Graduação em Ciência Animal.

Linha de pesquisa: Sanidade Animal

Orientador: Dr. Jean Berg Alves da Silva – UFERSA

MOSSORÓ- RN
2017

© Todos os direitos estão reservados a Universidade Federal Rural do Semi-Árido. O conteúdo desta obra é de inteira responsabilidade do (a) autor (a), sendo o mesmo, passível de sanções administrativas ou penais, caso sejam infringidas as leis que regulamentam a Propriedade Intelectual, respectivamente, Patentes: Lei nº 9.279/1996 e Direitos Autorais: Lei nº 9.610/1998. O conteúdo desta obra tomar-se-á de domínio público após a data de defesa e homologação da sua respectiva ata. A mesma poderá servir de base literária para novas pesquisas, desde que a obra e seu (a) respectivo (a) autor (a) sejam devidamente citados e mencionados os seus créditos bibliográficos.

M488q Medeiros, Natália Cristina de .

Qualidade do leite utilizado em queijarias artesanais no Rio Grande do Norte / Natália Cristina de Medeiros. - 2017.

42 f. : il.

Orientador: Jean Berg Alves da Silva.
Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal

Rural do Semi-árido, Programa de Pós-graduação em
Ciência Animal, 2017.

1. Leite. 2. Queijo. 3. Resíduos. 4. Qualidade.

O serviço de Geração Automática de Ficha Catalográfica para Trabalhos de Conclusão de Curso (TCC's) foi desenvolvido pelo Instituto de Ciências Matemáticas e de Computação da Universidade de São Paulo (USP) e gentilmente cedido para o Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal Rural do Semi-Árido (SISBI-UFERSA), sendo customizado pela Superintendência de Tecnologia da Informação e Comunicação (SUTIC) sob orientação dos bibliotecários da instituição para ser adaptado às necessidades dos alunos dos Cursos de Graduação e Programas de Pós-Graduação da Universidade.

NATÁLIA CRISTINA DE MEDEIROS

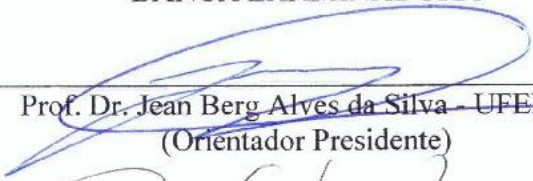
**QUALIDADE DO LEITE UTILIZADO EM QUEIJARIAS ARTESANAIS NO RIO
GRANDE DO NORTE**

Dissertação apresentada à Universidade
Federal Rural do Semi-Árido (UFERSA),
como exigência final para obtenção do título
de Mestre no curso de Pós-Graduação em
Ciência Animal.

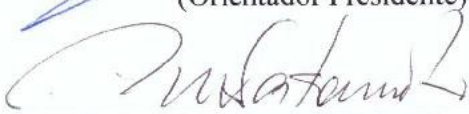
Linha de pesquisa: Sanidade Animal

Aprovação em: 17/02/2017

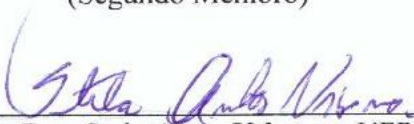
BANCA EXAMINADORA



Prof. Dr. Jean Berg Alves da Silva - UFERSA
(Orientador Presidente)



Prof. Dr. Sidnei Miyoshi Sakamoto - UFERSA
(Segundo Membro)



Profa. Dra. Stela Antas Urbano – UFRN
(Terceiro Membro)

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

NATÁLIA CRISTINA DE MEDEIROS, filha de José Lenildo de Medeiros e Lucia Vieira de Medeiros, nasceu no dia 27 de agosto de 1991, na cidade de Jardim do Seridó/RN. Coursou o ensino médio no Colégio Diocesano Seridoense, em Caicó/RN, concluindo-o no ano de 2008. Iniciou o ensino superior em março de 2010, na Universidade Federal Rural do Semi-Árido, onde graduou-se em Medicina Veterinária, em fevereiro de 2015. Como acadêmica, atuou como estagiária nas áreas de Bioquímica, Clínica de Pequenos Animais, Patologia Clínica e Inspeção de Produtos de Origem Animal e foi bolsista de Iniciação Científica, desenvolvendo trabalhos nas áreas de Clínica de Pequenos Animais e Inspeção de Produtos de Origem Animal. Em março de 2015, ingressou no Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal da Universidade Federal Rural do Semi-Árido. No decorrer do curso de Mestrado, foi bolsista CAPES, realizando estágio em docência nas disciplinas de Inspeção de Alimentos de Origem Animal, para turmas de Medicina Veterinária, e Higiene Animal, para turmas de Zootecnia. Atuando na linha de pesquisa em Sanidade Animal, adquiriu experiência em Microbiologia e Inspeção de Produtos de Origem Animal.

A Santana Medeiros, minha avó, e Evaní Medeiros, minha tia, dois anjos, que foram grandes incentivadoras para que eu continuasse no meio acadêmico.

A José Lenildo de Medeiros e Lúcia Vieira de Medeiros, meus pais, que, com tanto amor e carinho, sempre estiveram presentes em toda a minha jornada, apoiando nos momentos mais difíceis e encorajando a continuar.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por ter me dado o dom da vida, por ser minha fortaleza e nunca me desamparar. Todas as minhas vitórias são para honra e glória do Teu nome.

Aos meus pais, por serem as pessoas mais incríveis deste mundo, que me ajudaram a ser quem eu sou, muito obrigada. Toda a minha gratidão para vocês.

À minha avó Santana, que tanto sonhou com meu crescimento acadêmico e não mediu esforços para que eu pudesse progredir. À minha tia Evaní, que sempre orou para que esse momento chegasse e esteve ao meu lado ao longo do caminho. Infelizmente, não estão mais aqui, mas grande parte disto é para vocês. Minha gratidão é eterna.

Aos meus irmãos, por terem sido exemplos de irmãos mais velhos, muito obrigada. Ezaú, Andréa e Eliú, vocês são grandes presentes.

Aos meus tios, tias, sobrinhos, sobrinha, cunhadas, cunhado, vocês são fundamentais para meu crescimento.

À Diana, presente em todos os momentos desta etapa. Muito obrigada por seu apoio, desde a primeira aula que dei, lá no início do mestrado, até agora, passando por várias aventuras, suporte, ajuda na estatística e, acima de tudo, companheirismo na vida.

A todos os meus amigos, vocês foram importantes para que eu chegasse até aqui. Um agradecimento especial à Sara, um anjo colocado por Deus na minha vida. E à Rebeca, que me acompanha desde a graduação, nestas alegrias e tristezas do ensino superior.

Ao meu orientador, Jean Berg Alves da Silva, que, verdadeiramente, é um grande mestre. Muito obrigada pelo conhecimento que me passou desde a graduação, pelo auxílio na pesquisa, pelos conselhos e pela experiência transmitida.

Aos membros da banca, Jean, Stela e Sakamoto, muito obrigada por todas as considerações e por aceitarem participar deste momento tão importante na minha vida, dando contribuições excelentes.

À equipe LIPOA, muito obrigada por me acolher de forma tão amorosa e pelos dias tão agradáveis, mesmo acordando às 3 horas da manhã e saindo do laboratório às 23 horas, em dias de coleta.

A todos os professores que passaram pela minha vida, muito obrigada. Vocês me inspiraram a seguir este caminho. Cada um, à sua maneira, contribuiu de forma significativa para minha formação. Muito obrigada por todos os ensinamentos.

Aos animais, que, indiretamente, trouxeram-me até aqui, muito obrigada por espalharem amor no mundo.

Aos produtores e funcionários das queijarias, muito obrigada por aceitarem participar deste trabalho e contribuírem com esta pesquisa.

Às agências de fomento à pesquisa, muito obrigada pelo suporte através das bolsas e do financiamento dos equipamentos e materiais de laboratório.

E a todos que contribuíram para a minha formação pessoal e acadêmica, direta ou indiretamente, agradeço de todo o meu coração. A todos, muito obrigada.

"Cada pessoa deve trabalhar para o seu aperfeiçoamento e, ao mesmo tempo, participar da responsabilidade coletiva por toda a humanidade."

Marie Curie

QUALIDADE DO LEITE UTILIZADO EM QUEIJARIAS ARTESANAIS NO RIO GRANDE DO NORTE

MEDEIROS, Natália Cristina de. Qualidade do leite utilizado em queijarias artesanais no Rio Grande do Norte. 2017. 42f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal: Sanidade Animal) - Universidade Federal Rural do Semi-Árido, Mossoró-RN, 2017.

RESUMO: Os queijos artesanais participam da identidade sociocultural do povo e merecem valorização. Como muitos queijos produzidos de forma artesanal, é comum a fabricação dos queijos de coalho e de manteiga com leite cru. Por isso, é fundamental que a matéria-prima das queijarias apresente boa qualidade, a fim de minimizar riscos aos consumidores. Dessa forma, objetivou-se avaliar a qualidade do leite em queijarias artesanais do Rio Grande do Norte, Brasil. Foram coletadas cinquenta amostras de leite de nove queijarias informais de regiões que se destacam como bacias leiteiras no Estado. As amostras foram submetidas às análises microbiológicas (microrganismos mesófilos estritos e facultativos viáveis, coliformes totais, termotolerantes, *Salmonella* spp. e *Staphylococcus aureus*), físico-químicas (acidez titulável em graus Dornic, densidade, índice crioscópico, estabilidade ao alizarol, porcentagens de proteína, lactose e gordura), residuais e pesquisa de fraudes recorrentes em leite. Todas as amostras ultrapassaram o limite estabelecido pela legislação para contagem de microrganismos mesófilos; houve presença de *Salmonella* spp. em uma amostra. Dada esta contaminação, a acidez de 76% das amostras estava acima do permitido pela legislação. Quanto aos parâmetros de gordura e proteína, 14% e 10% das amostras estavam abaixo dos valores exigidos pela legislação, respectivamente. Além disso, houve fraude por adição de água em 24% das amostras. Foram encontrados cloretos em 16% e resíduos de antimicrobianos em 46% das amostras. Portanto, a qualidade do leite usado na fabricação informal de queijo artesanal no estado do Rio Grande do Norte é pobre, podendo representar um risco para o consumidor, com o comprometimento da qualidade dos queijos de coalho e de manteiga.

Palavras-Chave: Fraude. Leite. Queijo. Resíduos.

QUALITY OF MILK USED IN ARTISANAL CHEESE FACTORIES IN RIO GRANDE DO NORTE

MEDEIROS, Natália Cristina de. Quality of milk used in artisanal cheese factories in Rio Grande do Norte. 2017. 42f. Dissertation (Master Degree in Animal Science: Animal Health) - Universidade Federal Rural do Semi-Árido, Mossoró-RN, 2017.

ABSTRACT: Artisanal cheeses participate in the socio-cultural identity of people and deserve recognition. Like many artisanally produced cheeses, it is common to produce coalho and butter cheeses from raw milk. For this reason, it is essential that the raw material from dairies is of good quality to minimize risks to consumers. Thus, this study aimed to evaluate the quality of milk in artisanal cheese factories in Rio Grande do Norte, Brazil. Fifty samples of milk in nine artisanal cheese factories were collected from areas that stand out in dairy production in the state. These samples underwent microbiological (viable strict and facultative mesophilic bacteria, total and thermotolerant coliforms, *Salmonella* sp., and *Staphylococcus aureus*) and physical-chemical analysis (titratable acidity in Dornic degrees, density, cryoscopy, stability to alizarol, and percentages of protein, lactose, and fat contents), and antibiotic residue and recurrent fraud in milk were conducted. All samples exceeded the limit established by law for mesophilic bacteria counting; *Salmonella* spp. was found in one sample. Given this contamination, the acidity of 76% of the samples was higher than allowed by the legislation. Regarding fat and protein parameters, 14% and 10% of the samples were below the required values by the legislation, respectively. Furthermore, there was fraud by adding water in 24% of samples. Chlorides were found in 16% and antimicrobial residues in 46% of samples. Therefore, the quality of the milk used in informal artisanal cheese making in the state of Rio Grande do Norte is poor and may pose a risk to consumers, with the loss of quality of coalho and butter cheeses.

Keywords: Fraud. Milk. Cheese. Residues.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Frequências absoluta e relativa para análises de densidade, crioscopia, gordura, proteína e acidez em amostras de leite cru usadas para produção de queijos (coalho e manteiga) em queijarias artesanais do Rio Grande do Norte, Brasil, 2015.....24

Tabela 2 – Frequências absoluta e relativa de fraudes em amostras de leite cru usadas para produção de queijos (coalho e manteiga) em queijarias artesanais do Rio Grande do Norte, Brasil, 2015.....25

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Mediana, valores máximo e mínimo, primeiro e terceiro quartis para contagem de <i>Staphylococcus aureus</i> e bactérias mesófilas e enumeração de coliformes totais e termotolerantes em amostras de leite cru usadas para produção de queijos (coalho e manteiga) em queijarias artesanais do Rio Grande do Norte, Brasil, 2015.....	22
--	----

LISTA DE SIGLAS E SÍMBOLOS

DVA – Doenças Veiculadas por Alimentos

IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística

IN – Instrução Normativa

NMP – Número Mais Provável

UFC – Unidade Formadora de Colônia

% - Porcentagem

°C – Graus Celsius

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	14
2	OBJETIVOS.....	17
2.1	GERAL.....	17
2.2	ESPECÍFICOS.....	17
3	MATERIAL E MÉTODOS.....	18
3.1	LOCAL DO ESTUDO E OBTENÇÃO DAS AMOSTRAS.....	18
3.2	ANÁLISE MICROBIOLÓGICA.....	18
3.3	ANÁLISE FÍSICO-QUÍMICA.....	19
3.4	PESQUISA DE RESÍDUOS.....	20
3.5	PESQUISA DE FRAUDES.....	21
3.6	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	21
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	22
5	CONCLUSÕES.....	27
	REFERÊNCIAS.....	28
	APÊNDICE A.....	31

1 INTRODUÇÃO

O leite é o produto oriundo de ordenha completa, ininterrupta, em condições de higiene, de animais sadios, bem alimentados e descansados (BRASIL, 2008). Sendo um produto alimentar de grande valor nutricional e a matéria-prima primordial para a fabricação do queijo, a qualidade do leite é definida por parâmetros relacionados à composição química, características físico-químicas e de higiene (BRITO, 1998).

O Brasil tem se destacado entre os cinco maiores produtores de leite do mundo, produzindo cerca de 32 bilhões de litros de leite por ano; no entanto, esta produção não é suficiente para suprir a demanda do mercado interno. Além da insuficiência de leite, o leite produzido no Brasil não é de alta qualidade. O modelo brasileiro de pagamento por volume desmotiva os produtores a buscar melhorias na produção e na obtenção de leite, incita o transportador a captar leite, mesmo em desacordo com os padrões, e ainda pode motivar a prática de fraudes (SILVA, 2013).

Nesta situação, as condições higiênico-sanitárias inadequadas da matéria-prima, falhas no processamento, armazenamento, transporte e exposição do produto à contaminação durante a comercialização trazem, como consequência, queijos de baixa qualidade, expondo o consumidor ao risco de Doenças Veiculadas por Alimentos (DVA). Conseguir manter a qualidade desta matéria-prima, portanto, é o requisito principal que o produtor de queijo deve ter, para evitar prejuízos econômicos e preservar a saúde pública (DANTAS et al., 2013).

A boa qualidade microbiológica do leite, seja ele pasteurizado ou cru, pressupõe um gado saudável, boas práticas de higiene na ordenha e no manuseio do leite, higienização eficiente dos equipamentos e utensílios utilizados e, finalmente, o resfriamento do leite a temperaturas entre 0-4°C, no máximo 2 horas após a ordenha. Essas práticas permitem que o leite mantenha a qualidade microbiológica por até 72 horas, mas não significam ausência de bactérias. No Brasil essas condições são conseguidas pela maioria dos grandes produtores, mas o mesmo não pode ser dito dos médios e pequenos, que, em geral, participam da cadeia de produção artesanal (PERRY, 2004).

A produção artesanal é considerada uma estratégia de reprodução social e econômica, que merece valorização como patrimônio cultural (MENEZES et al., 2011). Os produtos artesanais, dentre os quais os queijos de coalho e manteiga, devem ser preservados, pois, além de participarem da identidade sociocultural e gastronômica do povo, indicam grande

variedade quanto às características físico-químicas, sensoriais e microbiológicas de cada alimento (MACHADO, 2002).

A produção de queijo, por exemplo, tem participação considerável na economia do Nordeste, principalmente na produção familiar, sendo importante na formação de renda dos pequenos produtores de leite. No Nordeste brasileiro, a maior parte da produção de queijos é obtida em pequenas e médias queijarias, que movimentam, mensalmente, milhões de reais, o que sinaliza um aspecto fundamental no âmbito social e econômico da região (PERRY, 2004).

No Estado do Rio Grande do Norte, as regiões do Seridó e Oeste Potiguar destacam-se como bacias leiteiras, sendo, também, grandes produtoras de derivados lácteos. As cidades pesquisadas neste trabalho somam 25.936.000 litros de leite produzidos por ano (IBGE, 2013). E a produção de queijos, apenas na região do Seridó, corresponde a 241.328 kg de queijo de manteiga e 74.039 kg de queijo de coalho, mensalmente. Desta produção, uma parcela significativa vem de queijarias artesanais (ADESE, 2008).

Disto, resulta uma grande importância da produção leiteira e de queijos para a economia local, que poderia ser maior, caso fosse dada maior atenção à qualidade da matéria-prima, já que a falta de critérios de qualidade da matéria-prima e das técnicas de processamento permite que o queijo se classifique no mercado de produtos de baixa qualidade, tanto do ponto de vista higiênico-sanitário quanto da falta de padronização do produto, o que reduz o valor de mercado (NASSU et al., 2001).

Parte da produção de queijos artesanais utiliza o leite sem tratamento térmico, e esses queijos têm sido produzidos por causa do seu intenso e forte sabor, quando comparados aos queijos fabricados com leite pasteurizado (YOON et al., 2016). A produção artesanal com leite cru também tem apoio no fato de o aquecimento do leite poder destruir seus benefícios nutricionais. No entanto, o elevado valor nutricional, associado ao pH próximo ao neutro e elevada atividade de água fazem do leite um excelente meio de crescimento para diferentes microrganismos, fazendo com que os consumidores possam desenvolver DVA (CLAEYS et al., 2013).

Outro risco à saúde dos consumidores são os resíduos de medicamentos veterinários nos derivados lácteos. Sabendo-se que há falta de higiene em uma parcela da cadeia produtiva do leite e seus derivados, não é incomum que haja uso indiscriminado de antimicrobianos. Quando o período de carência, a dosagem e a via de administração destes fármacos são desrespeitados, ocorre a presença de resíduos indesejáveis nos alimentos de origem animal (NETTO et al., 2005). A presença de resíduos de antibióticos no leite interfere na fabricação

de alguns produtos lácteos, podendo ocasionar no homem reações alérgicas, além de resistência à terapia antimicrobiana.

Além disso, a qualidade e composição do leite também podem ser afetadas, após a ordenha, pela adição de substâncias estranhas ou fraudulentas. De acordo com a legislação, considera-se fraudado, adulterado ou falsificado o leite que: for adicionado de água; tiver sofrido subtração de qualquer dos seus componentes, exceto a gordura em leites específicos; for adicionado de substâncias conservadoras ou quaisquer elementos estranhos à sua composição; for de um tipo e se apresentar rotulado como de outro; estiver cru e for vendido como pasteurizado; e for exposto ao consumo sem as devidas garantias de inviolabilidade (BRASIL, 2008).

A ocorrência de fraude no leite, como matéria-prima e pronto para consumo, representa um desfalque econômico e diminui o rendimento industrial, além de estar associado a problemas de saúde do consumidor (ROBIM et al., 2012).

O leite é um dos alimentos mais envolvidos em fraudes. Estas fraudes acontecem com frequência no leite destinado à produção de queijos, já que a obtenção desse produto, em sua maioria, ocorre de forma artesanal, em unidades de produção caseira e propriedades rurais de pequeno porte, tornando difícil o controle pelos órgãos de inspeção (FERREIRA et al., 2008).

As fraudes de natureza econômica mais praticadas no leite fluido são adição de água, adição de substâncias neutralizantes, reconstituintes da densidade e adição de soro de leite (FREITAS FILHO et al., 2009).

Neste sentido, sabendo a importância econômica da produção artesanal dos queijos de coalho e de manteiga para o Rio Grande do Norte e, ao mesmo tempo, a tradição de produção destes queijos com leite cru, bem como o consumo dos queijos crus e falta de fiscalização das queijarias artesanais, objetivou-se avaliar a qualidade do leite utilizado em queijarias artesanais informais neste estado.

2 OBJETIVOS

2.1 GERAL

Avaliar a qualidade do leite utilizado como matéria-prima em queijarias artesanais informais no Rio Grande do Norte.

2.2 ESPECÍFICOS

- a) Verificar a qualidade microbiológica do leite utilizado como matéria-prima em queijarias artesanais informais no Rio Grande do Norte;
- b) Mensurar os parâmetros físico-químicos do leite utilizado como matéria-prima em queijarias artesanais informais no Rio Grande do Norte;
- c) Pesquisar resíduos de antimicrobianos no leite utilizado como matéria-prima em queijarias artesanais informais no Rio Grande do Norte;
- d) Pesquisar ocorrência de fraudes no leite utilizado como matéria-prima em queijarias artesanais informais no Rio Grande do Norte.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 LOCAL DO ESTUDO E OBTENÇÃO DAS AMOSTRAS

As amostras de leite foram obtidas de nove queijarias artesanais informais, sem inspeção, produzindo, em média, 360 kg de queijo por dia, de forma tradicional, situadas nas mesorregiões central e oeste do estado do Rio Grande do Norte. As queijarias foram selecionadas segundo os critérios de estarem presentes nas mesorregiões de maior produção de leite do Estado, serem produtoras de queijos artesanais de coalho e de manteiga e aceitarem participar da pesquisa.

Foram realizadas seis coletas, com intervalos de quinze dias entre elas, entre os meses de julho a setembro de 2015. Foi coletado um litro de leite de cada uma das nove queijarias, a cada visita. Na primeira coleta, entretanto, apenas cinco queijarias estavam disponíveis, o que resultou em um total de cinquenta amostras, sendo cinco da primeira coleta e quarenta e cinco das nove queijarias em cada uma das cinco coletas subsequentes. As amostras foram obtidas em recipientes estéreis, diretamente do tanque de recepção dos estabelecimentos e, em seguida, direcionadas, devidamente refrigeradas para o laboratório de Inspeção de Produtos de Origem Animal (LIPOA) da Universidade Federal Rural do Semi-Árido (UFERSA), onde foram submetidas às análises microbiológicas, físico-químicas, presença de resíduos de antimicrobianos e ocorrência de fraudes, no mesmo dia da coleta.

3.2 ANÁLISE MICROBIOLÓGICA

Nas análises microbiológicas foram pesquisados microrganismos mesófilos estritos e facultativos viáveis, coliformes a 35 e 45° e *Salmonella* spp. de acordo com a Instrução Normativa 62, do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento do Brasil (BRASIL, 2003), e *Staphylococcus aureus*, utilizando PETRIFILM™.

Foram diluídos 25 mL de cada amostra em 225 mL de água peptonada 0,1%, correspondendo à diluição 10^{-1} , a partir da qual foram obtidas as demais diluições decimais em 9 mL de água peptonada 0,1% até a diluição de 10^{-4} , em diluições sucessivas.

Na contagem total de bactérias mesófilas, as diluições de cada amostra foram semeadas, em duplicata, utilizando a técnica de semeadura em profundidade, empregando-se o meio “Plate Count Agar”. Logo após a solidificação do meio, as placas foram incubadas em

estufa a 36°C por 48 horas e, em seguida, realizadas as contagens com auxílio de um contador de colônias, segundo técnica padrão, em placas contendo de 25 a 250 unidades formadoras de colônias (UFC). A média do número de colônias contadas nas placas em duplicata multiplicada pelo fator de diluição das amostras correspondentes forneceu o número de UFC de microrganismos mesófilos por mL da amostra.

Quanto à presença de coliformes, as diluições foram inoculadas em caldo verde brilhante bile lactose a 2% a $36 \pm 1^\circ\text{C}$ por 48 horas, em banho maria, para confirmação de coliformes a 35°. Os tubos positivos foram repicados e colocados em tubos com caldo EC a $45^\circ\text{C} \pm 0,2^\circ\text{C}$ por 48 horas, em banho maria, para pesquisa de coliformes a 45°. Após a leitura, foi verificado o número mais provável de coliformes a 35 e 45°, por meio de tabela de NMP.

Para a pesquisa de *Salmonella* spp., a diluição 10^{-1} das amostras foi incubada em estufa a 36°C por 20 horas. A diluição de cada amostra foi pipetada nas quantidades de 0,1mL, 1mL, 1mL em tubos contendo os caldos Rappaport Vassiliadis, Selenito e Tetrationato, respectivamente, e incubados em banho maria a 41°C por 24 horas. Em seguida, as amostras foram semeadas, em placas contendo Agar *Salmonella* Diferencial (Rambach) e Agar *Salmonella Shigella* (SS), sendo incubadas em estufa a 36°C por 24 horas. As placas que apresentaram crescimento de colônias foram repicadas em tubos contendo Agar Tríplice Açúcar Ferro (TSI) e Agar Lisina Ferro (LIA). Estes, por sua vez, foram incubados em estufa a 36° C por 24 horas. Os tubos positivos foram repicados em Agar Uréia, sendo incubados a 36° C por 24 horas. Aqueles que apresentaram mudança de cor indicaram presença de microrganismos urease positivos, descaracterizando, portanto, *Salmonella* spp.

Para a pesquisa de *Staphylococcus aureus*, utilizou-se placa 3M™ PETRIFILM™, seguindo as recomendações do fabricante para inoculação e leitura.

Os resultados de microrganismos mesófilos estritos e facultativos viáveis, coliformes a 35 e 45°, e *Staphylococcus aureus* foram transformados em Log 10.

3.3 ANÁLISE FÍSICO-QUÍMICA

Os parâmetros físico-químicos avaliados, segundo metodologia convencional recomendada pelo Instituto Adolf Lutz (BRASIL, 2005), foram: acidez titulável em graus Dornic, densidade, índice crioscópico e estabilidade ao alizarol. Foram pesquisados por ultrassom os parâmetros de proteína, lactose e gordura.

Para medir acidez titulável, em graus Dornic, foram transferidos 10 mL de cada amostra de leite para um béquer de 100 mL. Adicionaram-se 5 gotas da solução de

fenolftaleína 1% e, então, foi realizada a titulação com solução Dornic até o aparecimento de coloração rósea, persistente por 30 segundos. Cada 0,1 mL titulado de solução corresponde a 1º Dornic. Assim, foi feita a leitura do volume gasto. Para a prova do alizarol, foram adicionados, em tubo de ensaio, 2 mL de leite e 2 mL de alizarol. As substâncias foram misturadas e a reação observada. Leite instável apresentou coagulação e cor amarelada. Leite normal não teve coagulação e a coloração formada foi roxa clara.

A densidade, por sua vez, foi feita adicionando cada amostra, previamente resfriada e homogeneizada, em uma proveta de 250 mL. Em seguida, o termolactodensímetro, da Incoterm®, foi mergulhado, sem atingir as paredes da proveta e, após estabilização, foi realizada a leitura, expressando a densidade a 15 °C, de acordo com tabela fornecida pelo fabricante. Quanto ao índice crioscópico, a análise deu-se através do crioscópio eletrônico Microlak, da Entelbra®. Foram seguidas as instruções do fabricante para calibração do equipamento e banho refrigerante. Depois de calibrado, cada amostra, em triplicata, foi inserida para leitura. Entre as análises, o sensor foi lavado com água destilada e seco, cuidadosamente.

Também foram pesquisados os parâmetros de proteína, lactose e gordura, obtidos, em duplicata, através do analisador de leite ultrassônico Ekomilk total®, seguindo as recomendações do fabricante. Entre cada amostra, o equipamento foi lavado com água destilada e seco com papel.

3.4 PESQUISA DE RESÍDUOS

Os resíduos no leite foram pesquisados através do teste Eclipse 50®, que consegue detectar os seguintes antimicrobianos: Penicilina G, Ampicilina, Amoxicilina, Oxacilina, Cloxacilina, Cefalexina, Cefapirina, Sulfatiazol, Sulfametacina, Sulfanilamida, Oxitetraciclina, Tetraciclina, Eritromicina, Tilosina, Neomicina e Estreptomicina.

As amostras foram preparadas, inicialmente, sendo aquecidas a 82 °C por 5 minutos, a fim de inativar os fatores inespecíficos antibacterianos presentes no leite.

Após a inativação dos fatores inespecíficos, foram pipetados 50µL de cada amostra de leite em recipiente de inoculação. Os recipientes foram vedados e incubados a 65°C por 2 horas e 30 minutos, como recomendado pelo fabricante. A leitura foi realizada pela parte lateral do tubo. Os tubos de cor amarela-esverdeada representaram resultados negativos, e os de cor azul, positivos.

3.5 PESQUISA DE FRAUDES

Foram pesquisadas fraudes recorrentes em leite, como: adição de água; adição do conservante peróxido de hidrogênio; presença de substâncias alcalinas; presença de amido e cloretos, como reconstituintes de densidade.

Para pesquisa de adição de água ao leite, foram avaliados os resultados de densidade e índice crioscópico. Quanto aos cloretos, em tubo de ensaio, foram colocados 10 mL da amostra testada, adicionados 0,5 mL de cromato de potássio 5% e 4,5 mL de nitrato de prata 0,1 mol/L. O tubo de ensaio foi agitado e observada a coloração. Cloretos em faixa superior ao normal apresentaram coloração amarela. Para pesquisa de amido, foram transferidos 10 mL da amostra para tubo de ensaio, aquecidos em banho-maria a 35°C e adicionadas duas gotas de lugol. Coloração azul indica presença de amido. O peróxido de hidrogênio foi pesquisado transferindo 10 mL da amostra para tubo de ensaio, aquecendo em banho-maria a 35 °C. Em seguida foram adicionados 2 mL de guaiacol 1%. Cor salmão indica presença de peróxido de hidrogênio. Quanto às substâncias neutralizantes, em tubo de ensaio, foram pipetados 5 ml da amostra de leite e adicionadas 2 gotas de ácido rosólico 2%. Rosa indica presença de substâncias neutralizantes (BRASIL, 2006).

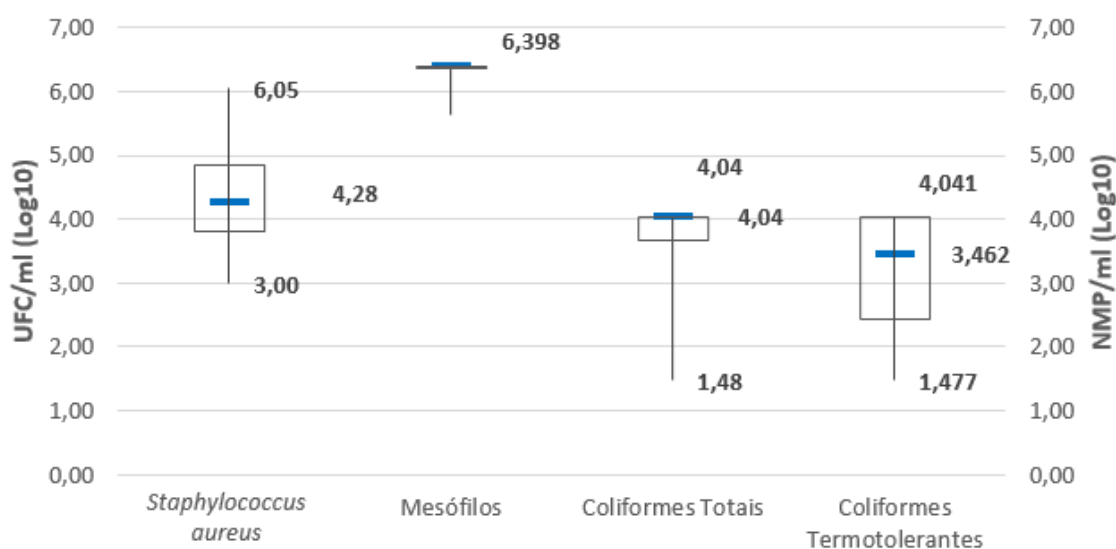
3.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados foram submetidos à análise estatística descritiva, elaborando um diagrama de caixas para os resultados de microrganismos mesófilos estritos e facultativos viáveis, coliformes totais e termotolerantes e *Staphylococcus aureus*, e construindo as frequências bruta e relativa para o resultado de *Salmonella* spp., resultados físico-químicos, pesquisa de resíduos e pesquisa de fraudes.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

O leite utilizado como matéria-prima para a produção dos queijos de coalho e de manteiga nas queijarias artesanais informais pesquisadas apresentou os resultados demonstrados na Figura 1, em Log 10.

Figura 1 – Mediana, valores máximo e mínimo, primeiro e terceiro quartis para contagem de *Staphylococcus aureus* e bactérias mesófilas e enumeração de coliformes totais e termotolerantes em amostras de leite cru usadas para produção de queijos (coalho e manteiga) em queijarias artesanais do Rio Grande do Norte, Brasil, 2015.



Os microrganismos mesófilos superaram o limite de 5,48 UFC/mL (Log 10) estabelecido pela legislação vigente, chegando a alcançar contagens de 6,398 UFC/mL (Log 10). Estes microrganismos são indicadores de higiene e os valores mais altos do que o permitido sugerem que as boas práticas de ordenha e manipulação não foram seguidas (BRASIL, 2011).

Como observado na figura 1, muitas amostras atingiram valores de 4,04 NMP/mL (Log 10) ou próximos disto para coliformes a 35°C. Para coliformes a 45°C, a distribuição foi mais variável. Apesar de a legislação brasileira não preconizar valores para coliformes, a presença deles deve ser considerada importante, pois, assim como microrganismos mesófilos, indicam falha nas boas práticas de manipulação, evidenciando que houve contaminação com matéria fecal, direta ou indiretamente (DANTAS et al., 2013).

Com base nas contagens de *Staphylococcus aureus*, que chegaram a 6,05 UFC/mL (Log10), detecta-se um problema de saúde pública, visto que estas bactérias podem causar intoxicação alimentar, produzindo potentes e danosas toxinas, termoestáveis e que permanecem ativas nos alimentos (YOON et al., 2016).

Outros trabalhos apontam que a menor qualidade do leite utilizado como matéria-prima nas queijarias pode estar relacionada com as altas contaminações por *Staphylococcus* spp. (LAMAITA et al., 2005; BORGES et al., 2008). Borelli et al. (2006) também confirmaram a presença de *Staphylococcus* spp. em leite cru utilizado na produção de derivados.

A contaminação por esses microrganismos em leite cru pode ocorrer devido à mastite, manipulação inadequada e higiene precária, em geral (BELLIO et al., 2016), práticas que já foram sugeridas pelos valores de microrganismos indicadores encontrados acima do permitido neste trabalho.

Salmonella spp., por sua vez, é um dos patógenos mais envolvidos em surtos alimentares no mundo e tem sido atribuída a sua contaminação em queijos por insuficiência na pasteurização do leite. Este gênero pode ser encontrado no trato intestinal de animais domésticos, silvestres e humanos. Em virtude disto, está associada ao não cumprimento das boas práticas de manipulação (SANTANA et al., 2008). Estudos mostram que a *Salmonella* spp. é uma das principais bactérias que podem ser transferidas a partir do leite cru para os seres humanos. A presença deste microrganismo em uma amostra é preocupante, já que a sua capacidade de causar toxinfecção é bastante relevante e sua presença em uma amostra torna o produto impróprio para consumo (BRASIL, 2003).

Os resultados microbiológicos, portanto, merecem atenção, pois as etapas de processamento dos queijos podem não garantir a eliminação dos microrganismos ou de suas toxinas, além disso, é uma prática comum o consumo dos queijos de coalho e de manteiga crus, o que aumenta potencialmente o risco de ocorrência de doenças veiculadas por alimentos e alerta para a necessidade de utilização de leite de qualidade na produção (PEIXOTO et al., 2007).

Os resultados físico-químicos, por sua vez, são apresentados na Tabela 1, em frequências absoluta e relativa das amostras.

Tabela 1 – Frequências absoluta e relativa para análises de densidade, crioscopia, gordura, proteína e acidez em amostras de leite cru usadas para produção de queijos (coalho e manteiga) em queijarias artesanais do Rio Grande do Norte, Brasil, 2015.

Ocorrência	Densidade (g/mL)	Crioscopia (°H)	Gordura (g/100g)	Proteína (g/100g)	Acidez (°D)
Dentro da Legislação	36 (72%)	6 (12%)	43 (86%)	45 (90%)	12 (24%)
Fora da Legislação	14 (28%)	44 (88%)	7 (14%)	5 (10%)	38 (76%)
Total (%)	50 (100)	50 (100)	50 (100)	50 (100)	50 (100)
IN 62	1028 a 1034	-0,530°H a -0,550°H	Mín. 3,0	Mín. 2,9	14°D a 18°D

Observou-se que 21 amostras (42%) ficaram instáveis na prova do alizarol, sugerindo leite ácido, que foi confirmado pela titulação. Como observado na Tabela 1, 76% das amostras estavam acima da acidez normal (18° D). A contagem de microrganismos no leite, acima do permitido pela legislação, pode justificar esta acidez, já que, com o decorrer do tempo de armazenamento e transporte até a queijaria, sem refrigeração, os microrganismos consomem a lactose e produzem ácido lático, elevando a acidez, reduzindo o pH, o que é refletido na instabilidade do leite (BRASIL, 2011).

Em relação aos parâmetros de composição, 14% das amostras estavam com valores de gordura abaixo do recomendado pela legislação e 10% das amostras com menos de 2,9 g/100g de proteína. A lactose, que não tem valores definidos na IN 62 (BRASIL, 2011), apresentou variação entre 4,89 g/100g e 5,49 g/100g. Venturoso et al. (2007), comparando resultados de composição obtidos por metodologia oficial e ultrassom, encontraram variações nos níveis de gordura de leite integral entre 2,37 e 3,60 g/100g, sem relatar diferença estatística significativa entre os métodos de análise. Santos et al. (2011a) encontraram 20% de amostras de leite pasteurizado padronizado com valores de gordura abaixo do exigido pela legislação e 60% das amostras abaixo dos valores de proteína. A quantidade de amostras abaixo do exigido pela legislação para gordura e proteína, neste trabalho, representa prejuízo para as queijarias, pois estes parâmetros comprometem diretamente o rendimento de produção de queijos, além de poderem interferir na consistência do produto final (SANTOS et al., 2011a).

O ponto de crioscopia e a densidade podem ser avaliados juntos para analisar a possibilidade de fraude por adição de água. Neste trabalho, os resultados foram sugestivos para esta fraude no leite ácido, em 24% das amostras, pois o ponto de congelamento estava abaixo de $-0,550^{\circ}\text{H}$ em 88% das amostras, e a densidade abaixo de 1028 g/mL em 24%, além de baixa porcentagem de sólidos. Ao adicionar água ao leite ácido, o ponto de crioscopia pode ser normal ou baixo, em comparação com a legislação, porque o equipamento também lê as moléculas de ácido láctico, que estão em solução. A adição de água ao leite pode reduzir o rendimento dos queijos, por diluição, e reduzir o teor de sólidos, como também pode piorar a qualidade microbiológica do leite, uma vez que, normalmente, é adicionada água não tratada. Além disso, o leite ácido pode levar a grandes perdas para o produtor, pois a acidez é a propriedade que tem maior influência na aptidão do leite à coagulação (CALAMARI et al., 2016).

Com relação às outras pesquisas de fraudes (Tabela 2), foi observado que apenas a presença de cloretos apresentou-se de forma significativa. Houve suspeita de fraude por adição de cloretos em 16% das amostras. No entanto, não se pode afirmar que a presença de cloretos seja indicativa de fraude por adição, a fim de reconstituir a densidade, já que o íon cloreto está presente na circulação sanguínea do animal, e, em processos inflamatórios, direciona-se ao lúmen dos alvéolos da glândula mamária, em virtude do aumento da permeabilidade vascular (ZAFALON et al., 2005). Dessa forma, com a detecção da maioria das amostras positivas para cloretos e para resíduos, é muito provável que a presença de cloretos seja resultado de mastite nos animais, os quais recebem tratamento, no entanto, o descarte do leite não é realizado adequadamente.

Tabela 2 – Frequências absoluta e relativa de fraudes em amostras de leite cru usadas para produção de queijos (coalho e manteiga) em queijarias artesanais do Rio Grande do Norte, Brasil, 2015.

Ocorrência	Cloretos	Neutralizantes	Amido	Peróxido de Hidrogênio
Negativo	42 (84%)	50 (100%)	50 (100%)	50 (100%)
Positivo	8 (16%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
Total (%)	50 (100)	50 (100)	50 (100)	50 (100)

O amido, assim como os cloretos, é uma forma de reconstituir a densidade, que pode ter sido alterada previamente pela adição de água. Já o peróxido de hidrogênio é uma substância conservadora, cuja adição acontece com a intenção de preservar as características da matéria-prima, através da inibição do desenvolvimento de microrganismos. As substâncias neutralizantes, por sua vez, visam mascarar a possível acidez resultante da elevada contagem de microrganismos. As substâncias neutralizantes e conservadoras, no entanto, além de representarem perdas econômicas, trazem grande risco à saúde dos consumidores, dados os seus efeitos no organismo (SANTOS et al., 2013). Neste trabalho, não foram encontradas estas fraudes. Mendes et al. (2010), pesquisando fraudes em leites comercializados informalmente na cidade de Mossoró/RN, verificaram que a única suspeita de fraude foi em relação à adição de água ao leite, que também foi detectada nesta pesquisa.

Observou-se que 46% das amostras pesquisadas apresentaram resíduos de antimicrobianos. A principal fonte destes resíduos em leite é o manejo inadequado de drogas no controle das mastites clínicas de vacas secas e em lactação. É bem provável que muitos animais dos rebanhos estejam acometidos por mastite, estejam recebendo tratamento e o leite está sendo destinado às queijarias artesanais, por haver menos controle do que nos laticínios inspecionados. A presença de resíduos no leite pode levar a muitas consequências, como a seleção de bactérias resistentes (SANTOS et al, 2011b).

No Rio Grande do Norte, onde foram coletadas as amostras para esta pesquisa, foi relatado o primeiro caso de infecção humana no Brasil por bactéria portando o gene *mcr-1*, que confere resistência à classe de antimicrobianos utilizados para tratar infecções por bactérias multirresistentes. Na América do Sul, a espécie *E. coli*, portando este gene, tem sido encontrada em animais produtores de alimentos desde 2012 (FERNANDES et al., 2016).

Este fato reforça a relevância dos dados encontrados nesta pesquisa, em que quase metade (46%) foi positiva para resíduos de antimicrobianos e serve de alerta para os órgãos responsáveis pela fiscalização e pela saúde, dadas as consequências negativas da presença de resíduos. O número elevado pode ser explicado pelo destino dado ao leite de baixa qualidade. Como estas amostras seriam recusadas pelas indústrias, os produtores destinam o leite às queijarias artesanais informais, colocando em risco a saúde dos consumidores e a qualidade do produto final.

5 CONCLUSÕES

O leite utilizado em queijarias artesanais apresentou contaminação microbiana e alterações físico-químicas além dos limites estabelecidos pela legislação. Além disso, a presença de resíduos de antimicrobianos e a fraude por adição de água também comprometeram a qualidade do leite.

Desta forma, a qualidade do leite usado na fabricação de queijo artesanal no estado do Rio Grande do Norte é pobre, o que coloca em risco a saúde dos consumidores, sendo necessário realizar a fiscalização destes estabelecimentos, bem como dispor de meios educativos para os produtores, a fim de aprimorar a qualidade dos queijos e garantir a segurança alimentar.

REFERÊNCIAS

ADESE. **Diagnóstico do uso da lenha nas atividades agroindustriais do território do Seridó/RN**. Caicó: ADESE, 2008. 36p.

BELLIO, A. et al. Behaviour of *Listeria monocytogenes* and *Staphylococcus aureus* in sliced, vacuum-packaged raw milk cheese stored at two different temperatures and time periods. **International Dairy Journal**, Edmonton, v. 57, n. 1, p. 15-19, 2016.

BORELLI, B. M. et al. Enterotoxigenic *Staphylococcus spp.* and other microbial contaminants during production of canastra cheese, Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 37, n. 4, p. 545-550, 2006.

BORGES, M. F. et al. Perfil de contaminação por *Staphylococcus* e suas enterotoxinas e monitorização das condições de higiene em uma linha de produção de queijo de coalho. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.38, n.5, p.1431-1438, 2008.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Decreto nº 30.691 de 29/03/1952 e alterado pela última vez pelo Decreto nº 6.385, de 27 de fevereiro de 2008. Regulamento da inspeção industrial e sanitária de produtos de origem animal – RIISPOA. **Diário Oficial [da] União**, Brasília, 27 fev 2008, p. 10785.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa 62, de 29 de dezembro de 2011. Regulamento Técnico de Produção, Identidade e Qualidade do Leite tipo A, de Leite Cru Refrigerado, de Leite Pasteurizado e o Regulamento Técnico da Coleta de Leite Cru Refrigerado e seu Transporte a Granel, em conformidade com os Anexos desta Instrução Normativa. **Diário Oficial [da] União**, Brasília, 30 dez 2011. Seção 1, p. 6.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. Instrução Normativa 62, de 26 de agosto de 2003. Oficializa os Métodos Analíticos Oficiais para Análises Microbiológicas para Controle de Produtos de Origem Animal e Água. **Diário Oficial [da] União**, Brasília, 18 set 2003. Seção 1, p. 14.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. Laboratório Nacional de Referência Animal. Instrução Normativa 68, de 12 de dezembro de 2006. Métodos oficiais analíticos físico-químicos para controle de leite e produtos lácteos. **Diário Oficial [da] União**, Brasília, 14 dez 2006, Seção 1, p. 8.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência de Vigilância Sanitária, ANVISA. Instituto Adolfo Lutz. **Métodos físico-químicos para análise de alimentos**. São Paulo: Ministério da Saúde, 2005. 821-829 p.

BRITO, J. R. F.; DIAS, J. C. **A qualidade do leite**. Juiz de Fora: Embrapa Gado de Leite. São Paulo: Tortuga, 1998. 88p.

CALAMARI, L.; GOBBI, L.; BANI, P. Improving the prediction ability of FT-MIR spectroscopy to assess titratable acidity in cow's milk. **Food Chemistry**, Barking, v. 192, n. 1, p. 477-484, 2016.

CLAEYS, W. L. et al. Raw or heated cow milk consumption: Review of risks and benefits.

Food Control, Reading, v. 31, n. 1, p. 251-262, 2013.

DANTAS, D. S. et al. Qualidade microbiológica do queijo de coalho comercializado no município de Patos, Estado da Paraíba. **ACSA**, Patos, v. 9, n. 3, p. 110-118, 2013.

FERNANDES, M. R. et al. First report of the globally disseminated incx4 plasmid carrying the mcr-1 gene in a Colistin-Resistant *Escherichia coli* Sequence Type 101 isolate from a human infection in Brazil. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, Washington, v. 60, n. 10, p. 6415-6417, 2016.

FERREIRA, W. L.; FREITAS FILHO, J. R. Avaliação da qualidade físico-química do queijo coalho comercializado no município de Barreiros-PE. **Revista Brasileira de Tecnologia Agroindustrial**, Ponta Grossa, v. 2, n. 1, p. 127-133, 2008.

FREITAS FILHO, J. R. et al. Caracterização físico-química e microbiológica do leite 'in natura' comercializado informalmente no município de Garanhuns – PE. **Revista Brasileira de Tecnologia Agroindustrial**, Ponta Grossa, v. 3, n. 2, p. 38-46, 2009.

IBGE, Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Indicadores IBGE - Estatística da Produção Pecuária. **Censo Pecuário 2013**. Rio de Janeiro, Mar./ 2013. Disponível em: <<http://www.cidades.ibge.gov.br/comparamun/compara.php?lang=&coduf=24&idtema=135&codv=v13&search=rio-grande-do-norte|mossoro|síntese-das-informacoes-2013>>. Acesso em: 19 ago. 2016.

LAMAITA, H. C. et al. Contagem de *Staphylococcus* sp. e detecção de enterotoxinas estafilocócicas e toxina da síndrome do choque tóxico em amostras de leite cru refrigerado. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 57, n. 5, p.702-709, 2005.

MACHADO, E.C. **Características físico-químicas e sensoriais do queijo Minas artesanal produzido na região do Serro, Minas Gerais**. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte. 2002.

MENDES, C. G. et al. Análises físico-químicas e pesquisa de fraude no leite informal comercializado no município de Mossoró, RN. **Ciência Animal Brasileira**, Goiânia, v. 11, n. 2, p. 349-356, 2010.

MENEZES, S. S. M. Queijo de coalho: tradição cultural e estratégia de reprodução social na região nordeste. **Revista de Geografia (UFPE)**, Recife, v. 28, n. 1, p.40-56, 2011.

NASSU, R.T. et al. Diagnóstico das condições de processamento de queijo de coalho e manteiga da terra no estado do Ceará. **Higiene alimentar**, São Paulo, v.15, n.89, p.28-36, 2001.

NETTO, D. P. et al. Levantamento dos principais fármacos utilizados no rebanho leiteiro do Estado do Paraná. **Acta Scientiarum Animal Sciences**, Maringá, v.27, n.1, p.145-151, 2005.

PEIXOTO, A.M.S.; PRAÇA, E.F.; GÓIS, V. A. A potencialidade microbiológica de coagulação do coalho líquido artesanal. **Revista Verde de Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável**, Pombal, v.2, n.2, p. 52–64, 2007.

PERRY, K.S.P. **Queijos: aspectos químicos, biológicos e microbiológicos. Química Nova**, v.27, p.293-300, 2004.

ROBIM, M. S. et al. Pesquisa de fraude no leite UAT integral comercializado no estado do Rio de Janeiro e comparação entre os métodos de análises físico-químicas oficiais e o método de ultrassom. **Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, Juiz de Fora, v.67, n. 389, p. 43-50, 2012.

SANTANA, R. F. et al. Qualidade microbiológica de queijo-coalho comercializado em Aracaju, SE. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 60, n. 6, p. 1517-1522, 2008.

SANTOS, A. F. S.; DUARTE, K. M. R.; POZZI, C. R. Detecção de resíduos de antimicrobianos no leite. **UNOPAR Científica Ciências Biológicas e da Saúde**, Londrina, v. 13, n. 3, p. 205-212, 2011b.

SANTOS, N. A. F. et al. Avaliação da composição e qualidade físico-química do leite pasteurizado padronizado comercializado na cidade de São Luís, MA. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 78, n. 1, p. 109-113, 2011a.

SANTOS, P. M.; PEREIRA-FILHO, E. R.; RODRIGUEZ-SAONA, L. E. Rapid detection and quantification of milk adulteration using infrared microspectroscopy and chemometrics analysis. **Food chemistry**, Barking, v. 138, n. 1, p. 19-24, 2013.

SILVA, L. C. C. **Capacidade de detecção de adulterações e suficiência das provas oficiais para assegurar a qualidade do leite pasteurizado**. 2013. 96f. Tese (Doutorado em Ciência Animal), Universidade Estadual de Londrina, Londrina, PR, 2013.

VENTUROSOSO, R. C. et al. Determinação da composição físico-química de produtos lácteos: estudo exploratório de comparação dos resultados obtidos por metodologia oficial e por ultrassom. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, São Paulo, v. 43, n. 4, p. 607-613, 2007.

YOON, Y.; LEE, S.; CHOI, K. H. Microbial benefits and risks of raw milk cheese. **Food Control**, Reading, v. 63, n. 1, p. 201-215, 2016.

ZAFALON, L. F. et al. Comportamento da condutividade e do conteúdo de cloretos do leite como métodos auxiliares de diagnóstico na mastite subclínica bovina. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Rio de Janeiro, v. 25, n. 3, p. 159-163, 2005.

APÊNDICE A - Quality of milk used in informal artisanal production of coalho and butter cheeses

ARTIGO ACEITO - QUALITY OF MILK USED IN INFORMAL ARTISANAL
PRODUCTION OF COALHO AND BUTTER CHEESES

Original do trabalho: Qualidade do leite utilizado na fabricação artesanal informal de queijos
de coalho e de manteiga

Aceito para publicação na Revista Semina: Ciências Agrárias

Quality of milk used in informal artisanal production of coalho and butter cheeses

Quality of milk used in informal artisanal production of coalho and butter cheeses

Qualidade do leite utilizado na fabricação artesanal informal de queijos de coalho e de manteiga

Natália Cristina de Medeiros^{1*}; Maria Rociene Abrantes²; Jovilma Maria Soares de Medeiros³; Maria Carla da Silva Campêlo³; Manoela de Oliveira Rebouças⁴; Maria Gabriela Alves Costa⁵; Jean Berg Alves da Silva²

Abstract: Artisanal cheeses such as coalho and butter participate in the socio-cultural identity of people and deserve recognition. Like many artisanal cheeses, it is common to produce coalho and butter cheeses from raw milk. For this reason, it is essential that the raw material from dairies is of good quality to minimize risks to consumers. Thus, this study aimed to evaluate the quality of milk in artisanal cheese factories in Rio Grande do Norte, Brazil. Fifty samples were collected from areas that stand out in dairy production in the state. These samples underwent microbiological and physical–chemical analysis, as well as antibiotic residue and fraud searches. Viable strict and facultative mesophilic bacteria were surveyed, in addition to total and thermotolerant coliforms, *Salmonella* sp., and *Staphylococcus aureus*; titratable acidity in Dornic degrees, density, cryoscopy, stability to alizarol, and percentages of protein, lactose, and fat contents were also measured, and tests for residues and recurrent fraud in milk were conducted. In general, all samples exceeded the limit established by law for mesophilic bacteria counting; *Salmonella* sp. was found in one sample. Given this contamination, the acidity of most samples was high. Furthermore, chlorides were found in 16% and antimicrobial residues in 46% of samples. Therefore, the quality of the milk used in informal artisanal cheese making in the state of Rio Grande do Norte is poor and may pose a risk to consumers, with the loss of quality of coalho and butter cheeses.

Key words: Cheese. Fraud. Raw material. Residues.

Resumo: Os queijos artesanais, como o de coalho e o de manteiga, participam da identidade sociocultural do povo e merecem valorização. Como muitos queijos artesanais, é comum a fabricação dos queijos de coalho e de manteiga com leite cru. Por isso, é fundamental que a matéria-prima das queijarias apresente boa qualidade, a fim de minimizar riscos aos consumidores. Dessa forma, objetivou-se avaliar a qualidade do leite em queijarias artesanais do Rio Grande do Norte, Brasil. Foram coletadas cinquenta amostras de regiões que se destacam como bacias leiteiras no estado. Elas foram submetidas às análises microbiológicas, físicas, químicas, residuais e pesquisa de fraudes. Foram pesquisados microrganismos mesófilos estritos e facultativos viáveis, coliformes totais, termotolerantes, *Salmonella* sp. e *Staphylococcus aureus*; acidez titulável em graus Dornic, densidade, índice crioscópico, estabilidade ao alizarol, porcentagens de proteína, lactose e gordura; também foram pesquisados resíduos e fraudes recorrentes em leite. De maneira geral, todas as amostras ultrapassaram o limite estabelecido pela legislação para contagem de microrganismos mesófilos; houve presença de *Salmonella* sp. em uma amostra. Dada esta contaminação, a acidez da maioria das amostras estava elevada. Além disso, foram encontrados cloretos em 16% e resíduos de

¹ Discente de Mestrado, Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, Universidade Federal Rural do Semi-Árido, UFERSA, Mossoró, RN, Brasil. E-mail: nataliam2@bol.com.br

² Professores Doutores, Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal Rural do Semi-Árido, UFERSA, Mossoró, RN, Brasil. E-mail: rocienevet3@hotmail.com; jeanberg@ufersa.edu.br

³ Discentes de Doutorado, Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, Universidade Federal Rural do Semi-Árido, UFERSA, Mossoró, RN, Brasil. E-mail: jovilmasoares@outlook.com; carlacampelo2@hotmail.com

⁴ Discente, Curso de Biotecnologia, Universidade Federal Rural do Semi-Árido, UFERSA, Mossoró, RN, Brasil. E-mail: manaelareboucas88@hotmail.com

⁵ Biotecnologista, Universidade Federal Rural do Semi-Árido, UFERSA, Mossoró, RN, Brasil. E-mail: mgabi_acosta@hotmail.com

antimicrobianos em 46% das amostras. Portanto, a qualidade do leite usado na fabricação informal de queijo artesanal no estado do Rio Grande do Norte não é boa, podendo representar um risco para o consumidor, com o comprometimento da qualidade dos queijos de coalho e de manteiga.

Palavras-chave: Fraude. Matéria-prima. Queijo. Resíduos.

Introduction

The production of artisanal cheese, such as coalho and butter cheeses, is considered a strategy for social and economic development, which deserves recognition as a cultural heritage (MENEZES, 2011). Part of the production of artisanal cheeses uses milk without heat treatment; they are produced this way because of their intense and strong flavor when compared to cheeses made from pasteurized milk (YOON et al., 2016). Craft production with raw milk also has support, given the fact that heating the milk can destroy its nutritional benefits and induce some detrimental effects. However, the high nutritional value associated with the neutral pH and high water activity makes milk an excellent growth medium for different microorganisms, exposing consumers to the risk of foodborne diseases (CLAEYS et al., 2013).

Another risk to consumer health is the residue of veterinary drugs in milk products. Several drugs are used in dairy cattle with prophylactic or curative purposes in an attempt to control mastitis. When the withdrawal time, dosage, and route of administration of these drugs are abused, undesirable residues are formed in food of animal origin (NETTO et al., 2005).

Moreover, the quality and composition of milk can be affected after milking with the addition of foreign or fraudulent substances. The most common frauds of an economic nature in the fluid milk are density reconstitution and the addition of water, neutralizing substances, or whey (FREITAS FILHO et al., 2009). The occurrence of fraud in milk as a raw material and when it is ready for consumption is an economic embezzlement and lowers industrial productivity, and it is associated with consumer health problems (ROBIM et al., 2012). In these terms, knowing the economic importance of the artisanal production of coalho and butter cheeses to Rio Grande do Norte, the tradition of producing these cheeses with raw milk, the consumption of raw cheeses, and the lack of supervision in craft dairies, this study aimed to evaluate the quality of the milk used in informal artisanal cheese factories in this state.

Material and Methods

Milk samples were obtained from nine informal artisanal cheese factories without inspection. These factories are located in central and western Potiguar, whose production occurs on a small and traditional scale. These factories were selected according to their location in mesoregions with higher production of milk in the state. Moreover, they had to be producing handmade coalho and butter cheeses and agree to participate in this research. Six collections were taken at intervals of 15 days from July to September 2015. We collected one liter of milk from each of the nine dairies every visit.

In the first collection, however, only five dairies were available, which resulted in a total of 50 samples: 5 from the first collection and 45 from nine dairies in each of the five subsequent collections. The samples were collected in sterile containers directly from the establishment's receiving tanks and then sent to the laboratory and properly refrigerated. There, they were subjected to microbiological and physical-chemical analyses on the day of collection to evaluate the presence of antimicrobial residues and the occurrence of fraud.

The microbiological analyses that were performed were surveys of viable strict and facultative mesophilic bacteria, total and thermotolerant coliforms, *Salmonella* sp., and *Staphylococcus aureus*. For the standard counting test of viable strict and facultative mesophilic microorganisms, total and thermotolerant coliforms, and *Salmonella* sp., samples were diluted in 9 mL of 0.1% peptone water until 10^{-4} successive dilutions according to the Normative Instruction 62 (NI 62) from the Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (BRASIL, 2003).

For the total count of mesophilic bacteria, dilutions of each sample were plated in duplicate using the in-depth plating technique, with "plate count agar". Immediately after solidification, the plates were incubated at 36 °C for 48 hours, and then the counts were held. The counts were performed using a colony counter according to a standard technique in plates containing 25–250 Colony-Forming Units (CFU). The average number of colonies counted in each plate in duplicate multiplied by the corresponding dilution factor provided the number of CFU mL⁻¹ of mesophilic bacteria in the sample.

For the coliforms, the dilutions were inoculated in 2% bright green bile lactose broth at 36 ± 1 °C for 48 hours to confirm total coliforms. Positive tubes were separated, and fractions were taken and placed in tubes with broth EC at 45 °C ± 0.2 °C for 48 hours to search for thermotolerant coliforms. After reading, the Most Probable Number (MPN) of thermotolerant coliforms was found through an MPN table.

In order to search for *Salmonella* sp., initially the 10^{-1} dilution of the samples at 36 °C was incubated for 20 hours. The dilution of each sample was pipetted in amounts of 0.1 mL, 1 mL, and 1 mL into tubes containing Rappaport Vassiliadis, Selenite, and Tetrathionate broths, respectively. These samples were incubated in a water bath at 41 °C for 24 hours. Then they were plated on agar plates containing Salmonella Differential (Rambach) and Salmonella Shigella Agar (SS) and incubated at 36 °C for 24 hours. The plates with colony growth had fractions transplanted into tubes containing agar Triple Sugar Iron (TSI) and Lysine Iron Agar (LIA), which were incubated at 36 °C for 24 hours. Positive tubes were transferred into agar urea and incubated at 36 °C for 24 hours. Samples that showed color change indicated the presence of urease-positive microorganisms, thus not featuring *Salmonella* sp. For *Staphylococcus aureus*, we used 3M™ PETRIFILM™, following the manufacturer's recommendations for inoculation and reading.

The physical-chemical parameters assessed, using a conventional methodology recommended by Adolf Lutz Institute (BRASIL, 2005), were titratable acidity in Dornic degrees; density, using the Incoterm® equipment; cryoscopic index, using the electronic cryoscope Microlak,

Entelbra®; and stability to alizarol. Protein, lactose, and fat contents were obtained by the ultrasonic milk analyzer Ekomilk Total® according to the manufacturer's recommendations.

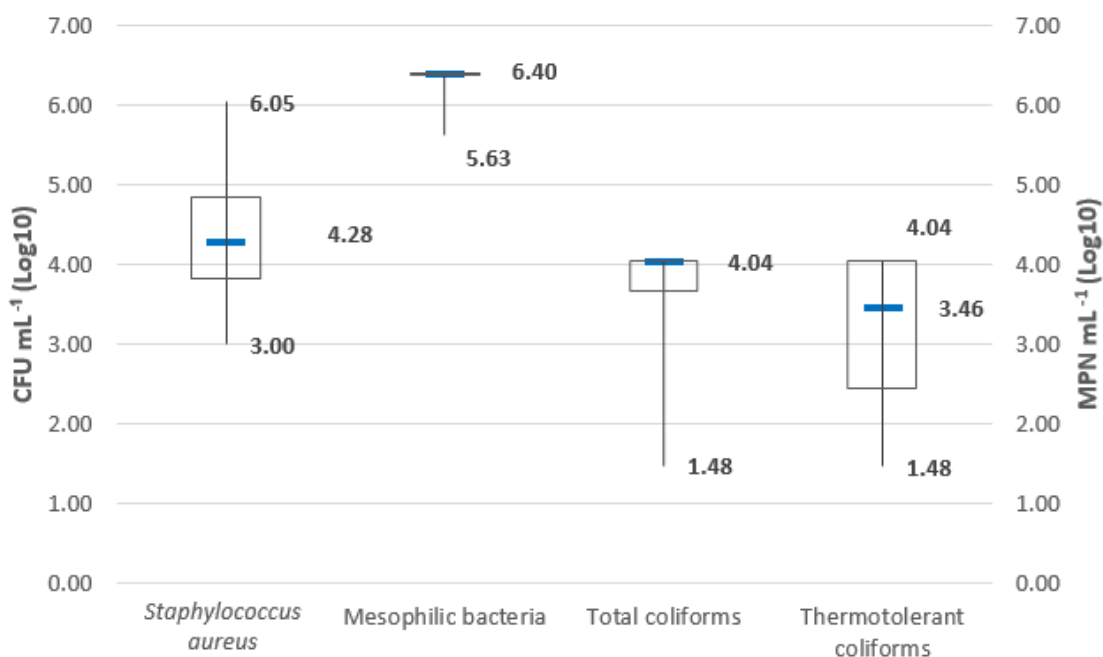
The drug residues in milk were surveyed through the Eclipse 50® test, which can detect the following antibiotics: Penicillin G, Ampicillin, Amoxicillin, Oxacillin, Cloxacillin, Cephalexin, Cefapirin, Sulfathiazole, Sulfametacin, Sulfanilamide, Oxytetracycline, Tetracycline, Erythromycin, Tylosin, Neomycin, and Streptomycin. Samples were prepared initially by heating to 82 °C for 5 minutes to inactivate non-specific antibacterial factors in milk. The manufacturer's instructions were followed for inoculation, incubation, and reading. In addition, recurring frauds in milk were searched, such as the addition of water and hydrogen peroxide and the presence of alkaline substances, starch, and chlorides for density reconstitution.

Results of density and freezing point were evaluated in order to see whether water was added in the milk. To check for the presence of chlorides, we added 0.5 mL of 5% potassium chromate and 4.5 mL of 0.1 mol L⁻¹ silver nitrate in a test tube with 10 mL of the sample. The test tube was shaken and the color was observed. Chlorides in the upper to normal range are yellow. In order to check if there was starch in the milk, a test tube with 10 mL of the sample was heated in a water bath at 35 °C, and two drops of Lugol were added to it. Blue color indicates the presence of starch. Hydrogen peroxide was investigated by transferring 10 mL of the sample into test tubes and heating them in a water bath at 35 °C. Then 2 mL of 1% guaiacol was added. Salmon color indicates the presence of hydrogen peroxide. As for neutralizing substances, 5 mL of the milk sample was pipetted into test tubes, and two drops of 2% rosolic acid was added to it. Pink color indicates the presence of neutralizing substances (BRASIL, 2006). Data were submitted to descriptive statistical analysis.

Results and discussion

The milk used as raw material for the production of coalho and butter cheeses in the informal artisanal cheese factories surveyed presented the results shown in Figure 1. Mesophilic microorganisms exceeded the limit of 5.48 CFU mL⁻¹ (log10) established by law in all samples, reaching scores of 6.398 CFU mL⁻¹ (log10). These microorganisms are hygienic indicators, and higher values than the allowed limit suggest that good milking and handling practices were not followed (BRASIL, 2011).

Figure 1. Median, maximum, and minimum values; first and third quartiles for counting *Staphylococcus aureus*; mesophilic bacteria; and enumeration of total and thermotolerant coliforms in samples of raw milk used for the production of artisanal cheeses (coalho and butter) in informal dairies of Rio Grande do Norte, Brazil, in 2015.



As seen in Figure 1, many samples reached values of 4.04 MPN mL⁻¹ (log10) or near it for coliforms at 35 °C. As for coliforms at 45 °C, the distribution was more variable. Although Brazilian law does not advocate values for coliforms at raw milk, their presence should be considered important, as for mesophilic bacteria, which indicate failure to maintain good handling practices, showing a high probability of fecal contamination, directly or indirectly (DANTAS et al., 2013).

Staphylococcus aureus counts, which reached 6.05 CFU mL⁻¹ (log10), detect whether there is a public health problem, as these bacteria can cause food poisoning, producing powerful and harmful toxins that are heat-stable and remain active in food (YOON et al., 2016). Other studies indicate that the lower quality of the milk used as raw material in dairies may be related to contamination by *Staphylococcus* spp. (BORGES et al., 2008; LAMAITA et al., 2005). Borelli et al. (2006) also confirmed the presence of *Staphylococcus* spp. in raw milk used in the production of derivatives. Contamination by such microorganisms in raw milk may occur due to mastitis, improper handling, and poor hygiene in general (BELLIO et al., 2016). The practices stated previously have been suggested due to the values of indicator organisms found in this work.

Salmonella sp. is one of the main pathogens involved in food outbreaks worldwide and has been linked to contamination in cheese due to inadequate pasteurization of milk. Bacteria from this genus are found in the intestinal tract of domestic and wild animals, as well as in humans. Because of this, it is associated with non-compliance of good handling practices (SANTANA et al., 2008). Studies show that *Salmonella* sp. is one of the bacteria that can be transferred from raw milk to humans. The presence of this organism in one sample in this research is worrying, since its ability to cause poisoning is quite relevant, and its presence in a sample makes the product unfit for consumption (BRASIL, 2003).

The microbiological results, therefore, require attention, because the cheese processing steps cannot guarantee the elimination of microorganisms or their toxins. In addition, it is common practice to consume raw coalho and butter cheeses, which increases the risk of foodborne illnesses and brings attention to the need to use quality milk during production (PEIXOTO et al., 2007).

The physical–chemical results are shown in Table 1. It was observed that 21 samples (42%) were unstable in the presence of alizarol, suggesting acidic milk, which was confirmed by titration. As seen in Table 1, 76% of the samples were above the normal acidity (18 °D). The counts of microorganisms above the law in the milk might explain this acidity, given that in the course of storage and transport to the dairy without cooling, the microorganisms consume lactose and produce lactic acid, increasing the acidity and reducing the pH, and such alterations are reflected in the milk (BRASIL, 2011).

Table 1. Absolute and relative frequencies in samples of raw milk used for the production of artisanal cheeses (coalho and butter) in informal dairies of Rio Grande do Norte, Brazil, in 2015 for analysis of density, cryoscopy, acidity, protein, and fat.

Ocurrence	Density	Cryoscopy	Fat	Protein	Acidity
Samples that obey the law	36 (72%)	6 (12%)	43 (86%)	45 (90%)	12 (24%)
Samples that do not obey the law	14 (28%)	44 (88%)	7 (14%)	5 (10%)	38 (76%)
Total (%)	50 (100)	50 (100)	50 (100)	50 (100)	50 (100)
NI 62	1028 to 1034	-0.530°H to -0.550°H	Min. 3.0	Min. 2.9	14°D to 18°D

Regarding the compositional parameters of the samples, 14% had fat values below those recommended by law, and 10% of samples had less than 2.9 g 100 g⁻¹ protein. Lactose, which has no values defined in the NI 62 (BRASIL, 2011), presented a variation of 4.89 g 100 g⁻¹ and 5.49 g 100 g⁻¹. Venturoso et al. (2007) compared the compositions of results obtained by the classic methodology and ultrasound, and they found variations in the levels of whole milk fat between 2.37 and 3.60 g 100 g⁻¹, without reporting a statistically significant difference between the methods of analysis. Santos et al. (2011a) found 20% of standardized pasteurized milk samples with values below the fat required by legislation, and 60% of the samples were below the protein values. As the number of samples is below that required by law for fat and protein, these parameters can directly compromise the cheese production yield and interfere with the consistency of the final product (SANTOS et al., 2011a).

The freezing point and density can be assessed together to examine the possibility of fraud by adding water. In this work, the results were suggestive of this fraud in acidic milk, because the freezing point (88%) had values below -0.550°H , and the density had values below 1028 g ml^{-1} (24%), in addition to a low percentage of solids. When adding water to acidic milk, the freezing point may be normal or low compared to the law, because the equipment also reads the lactic acid molecules, which are in the solution. The addition of water to milk can reduce the yield of cheeses by dilution, and reduce the solids content, and may worsen the microbiological quality of the milk, since untreated water is usually added. Alongside this, acidic milk can also lead to large losses for the producer, given that acidity is the milk property which has the most influence on the aptitude of milk to coagulation (CALAMARI et al., 2016).

With respect to other fraud research, only the presence of chlorides was a significant finding. There was suspicion of fraud by addition of chlorides in 16% of the samples. However, we cannot say that the presence of chlorides is indicative of fraud in order to reconstruct the density, since the chloride ion is present in the blood of animals and during inflammatory processes is directed to the lumen of the alveoli of the mammary gland due to increased vascular permeability (ZAFALON et al., 2005). Since the majority of samples were positive for chlorides and antibiotic residues, it is very likely that the presence of chlorides was the result of mastitis in animals, which are treated with drugs; however, the discarding of the milk during the withdrawal time was not performed properly.

Starch, as well as chlorides, is used for reconstructing the density of the milk, which may have been previously altered by the addition of water. On the other hand, hydrogen peroxide is a preservative substance whose addition is intended to preserve the characteristics of the raw materials by inhibiting the growth of microorganisms. The neutralizing substances are used to mask high acidity due to an elevated microorganism count. These neutralizing and conservative substances can represent economic losses and may cause great health risks to consumers, given their effects on the body (SANTOS et al., 2013). In this experiment, no such frauds were found. Mendes et al. (2010) researched frauds in milk commercialized informally in the city of Mossoró/RN, and the only suspected fraud found in that case was the addition of water to milk, which was also detected in our study.

We observed that 46% of the investigated samples showed antimicrobial residues. The main source of these milk residues is the inadequate management of drugs to control clinical mastitis in dry and lactating cows. It is likely that the animals affected by mastitis received treatment and that the milk was designed for cheese dairies, because they are under less control than inspected dairies. The presence of antibiotic residues in milk can have many consequences, such as the selection of resistant bacteria (SANTOS et al., 2011b).

In Rio Grande do Norte, where the samples were collected for this study, the first case was reported of human infection in Brazil by bacteria carrying the *mcr-1* gene, which confers resistance to the antibiotic class used to treat infections caused by multidrug-resistant bacteria. In South America,

E. coli species bearing this gene have been found in food-producing animals since 2012 (FERNANDES et al., 2016). This reinforces the relevance of the data found in this study, in which almost half (46%) was positive for antimicrobial residues, and serves as a warning to the inspection and health institutions, given the negative consequences of the presence of residues. The high number can be explained by the destination of the low-quality milk. As these samples would be rejected by industries, due to low quality, the milk is intended for informal artisanal cheese factories, which do not make the analysis of the milk, endangering the health of consumers and the quality of the final product.

Conclusion

The milk used in informal artisanal cheese dairies showed microbial contamination and physical and chemical changes beyond the limits permitted by law. Moreover, the presence of antimicrobial residues reduced the milk quality. There are suspicions of fraud by adding water. Thus, the quality of the milk used in informal artisanal cheese factories in the state of Rio Grande do Norte is poor, which endangers the health of consumers.

Acknowledgements

We thank the producers and employees of the cheese factories for agreeing to participate in this work and to contribute with this research. We also thank CAPES and CNPq for the support through scholarships and the financing of laboratory equipment and materials.

References

- BELLIO, A.; ASTEGIANO, S.; TRAVERSA, A.; BIANCHI, D. M.; GALLINA, S.; VITALE, N.; ZUCCON, F.; DECASTELLI, L. Behaviour of *Listeria monocytogenes* and *Staphylococcus aureus* in sliced, vacuum-packaged raw milk cheese stored at two different temperatures and time periods. *International Dairy Journal*, Edmonton, v. 57, n. 1, p. 15-19, 2016.
- BORELLI, B. M.; FERREIRA, E. G.; LACERDA, I. C. A.; SANTOS, D. A.; CARMO, L. S.; DIAS, R. S.; SILVA, M. C. C.; ROSA, C. A. Enterotoxigenic *Staphylococcus spp.* and other microbial contaminants during production of canastra cheese, Brazil. *Brazilian Journal of Microbiology*, São Paulo, v. 37, n. 4, p. 545-550, 2006.
- BORGES, M. F.; NASSU, R. T.; PEREIRA, J. L.; ANDRADE, A. P. C.; KUAYE, A. Y. Perfil de contaminação por *Staphylococcus* e suas enterotoxinas e monitorização das condições de higiene em uma linha de produção de queijo de coalho. *Ciência Rural*, Santa Maria, v. 38, n. 5, p. 1431-1438, 2008.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa 62, de 29 de dezembro de 2011. Regulamento Técnico de Produção, Identidade e Qualidade do Leite tipo A, de Leite Cru Refrigerado, de Leite Pasteurizado e o Regulamento Técnico da Coleta de Leite Cru Refrigerado e seu Transporte a Granel, em conformidade com os Anexos desta Instrução Normativa. *Diário Oficial [da] União*, Brasília, 30 dez 2011. Seção 1, p. 6.

_____. Secretaria de Defesa Agropecuária. Instrução Normativa 62, de 26 de agosto de 2003. Oficializa os Métodos Analíticos Oficiais para Análises Microbiológicas para Controle de Produtos de Origem Animal e Água. *Diário Oficial [da] União*, Brasília, 18 set 2003. Seção 1, p. 14.

_____. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. Laboratório Nacional de Referência Animal. Instrução Normativa 68, de 12 de dezembro de 2006. Métodos oficiais analíticos físico-químicos para controle de leite e produtos lácteos. *Diário Oficial [da] União*, Brasília, 14 dez 2006, Seção 1, p. 8.

_____. Ministério da Saúde. Agência de Vigilância Sanitária, ANVISA. Instituto Adolfo Lutz. *Métodos físico-químicos para análise de alimentos*. São Paulo: Ministério da Saúde, 2005. 821-829 p.

CALAMARI, L.; GOBBI, L.; BANI, P. Improving the prediction ability of FT-MIR spectroscopy to assess titratable acidity in cow's milk. *Food Chemistry*, Barking, v. 192, n. 1, p. 477-484, 2016.

CLAEYS, W. L.; CARDOEN, S.; DAUBE, G.; BLOCK, J. D.; DEWETTINCK, K.; DIERICK, K.; ZUTTER, L. D.; HUYGHEBAERT, A.; IMBERECHTS, H.; THIANGE, P.; VANDENPLAS, Y.; HERMAN, L. Raw or heated cow milk consumption: Review of risks and benefits. *Food Control*, Reading, v. 31, n. 1, p. 251-262, 2013.

DANTAS, D. S.; ARAÚJO, A. M.; SANTOS, J. O.; SANTOS, R. M. S.; RODRIGUES, O. G. Qualidade microbiológica do queijo de coalho comercializado no município de Patos, Estado da Paraíba. *Agropecuária Científica no Semiárido*, Campina Grande, v. 9, n. 3, p. 110-118, 2013.

FERNANDES, M. R.; MCCULLOCH, J. A.; VIANELLO, M. A.; MOURA, Q.; PÉREZ-CHAPARRO, P. J.; ESPOSITO, F.; SARTORI, L.; DROPA, M.; MATTÉ, M. H.; LIRA, D. P. A.; MAMIZUCA, E. M.; LINCOPAN, N. First report of the globally disseminated incx4 plasmid carrying the mcr-1 gene in a Colistin-Resistant *Escherichia coli* Sequence Type 101 isolate from a human infection in Brazil. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, Washington, v. 60, n. 10, p. 6415-6417, 2016.

FREITAS FILHO, J. R.; SOUZA FILHO, J. S.; GONÇALVES, T. M.; SOUZA, J. J. F.; SILVA, A. H. I.; OLIVEIRA, H. B.; BEZERRA, J. D. C. Caracterização físico-química e microbiológica do leite 'in natura' comercializado informalmente no município de Garanhuns - PE. *Revista Brasileira de Tecnologia Agroindustrial*, Ponta Grossa, v. 3, n. 2, p. 38-46, 2009.

LAMAITA, H. C.; CERQUEIRA, M. M. O. P.; CARMO, L. S.; SANTOS, D. A.; PENNA, C. F. A. M.; SOUZA, M. E. Contagem de *Staphylococcus* sp. e detecção de enterotoxinas estafilocócicas e toxina da síndrome do choque tóxico em amostras de leite cru refrigerado. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, Belo Horizonte, v. 57, n. 5, p. 702-709, 2005.

MENDES, C. G.; SAKAMOTO, S. M.; SILVA, J. B. A.; JÁCOME, C. G. M.; LEITE, A. I. Análises físico-químicas e pesquisa de fraude no leite informal comercializado no município de Mossoró, RN. *Ciência Animal Brasileira*, Goiânia, v. 11, n. 2, p. 349-356, 2010.

MENEZES, S. S. M. Queijo de coalho: tradição cultural e estratégia de reprodução social na região nordeste. *Revista de Geografia UFPE*, Recife, v. 28, n. 1, p. 40-56, 2011.

NETTO, D. P.; LOPES, M. O.; OLIVEIRA, M. C. S.; NUNES, M. P.; MACHINSKI JÚNIOR, M.; BOSQUIROLI, S. L.; BENATTO, A.; BENINI, A.; BOMBARDELLI, A. L. C.; VEDOVELLO FILHO, D.; MACHADO, E.; BELMONTE, I. L.; ALBERTON, M.; PEDROSO, P. P.; SCUCATO, E. S. Levantamento dos principais fármacos utilizados no rebanho leiteiro do Estado do Paraná. *Acta Scientiarum Animal Sciences*, Maringá, v. 27, n. 1, p. 145-151, 2005.

PEIXOTO, A. M. S.; PRAÇA, E. F.; GÓIS, V. A. A potencialidade microbiológica de coagulação do

coalho líquido artesanal. *Revista Verde de Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável*, Pombal, v. 2, n. 2, p. 52-64, 2007.

ROBIM, M. S.; CORTEZ, M. A. S.; SILVA, A. C. O.; FILHO, R. A. T.; GEMAL, N. H.; NOGUEIRA, E. B. Pesquisa de fraude no leite UAT integral comercializado no estado do Rio de Janeiro e comparação entre os métodos de análises físico-químicas oficiais e o método de ultrassom. *Instituto de Laticínios Cândido Tostes*, Juiz de Fora, v. 67, n. 389, p. 43-50, 2012.

SANTANA, R. F.; SANTOS, D. M.; MARTINEZ, A. C. C.; LIMA, Á. S. Qualidade microbiológica de queijo-coalho comercializado em Aracaju, SE. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, Belo Horizonte, v. 60, n. 6, p. 1517-1522, 2008.

SANTOS, A. F. S.; DUARTE, K. M. R.; POZZI, C. R. Detecção de resíduos de antimicrobianos no leite. *UNOPAR Científica Ciências Biológicas e da Saúde*, Londrina, v. 13, n. 3, p. 205-212, 2011b.

SANTOS, N. A. F.; LACERDA, L. M.; RIBEIRO, A. C.; LIMA, M. F. V.; GALVÃO, N. R.; VIEIRA, M. M.; SILVA, M. I. S.; TENÓRIO, T. G. S. Avaliação da composição e qualidade físico-química do leite pasteurizado padronizado comercializado na cidade de São Luís, MA. *Arquivos do Instituto Biológico*, São Paulo, v. 78, n. 1, p. 109-113, 2011a.

SANTOS, P. M.; PEREIRA-FILHO, E. R.; RODRIGUEZ-SAONA, L. E. Rapid detection and quantification of milk adulteration using infrared microspectroscopy and chemometrics analysis. *Food Chemistry*, Barking, v. 138, n. 1, p. 19-24, 2013.

VENTUROSOS, R. C.; ALMEIDA, K. E.; RODRIGUES, A. M.; DAMIN, M. R.; OLIVEIRA, M. N. Determinação da composição físico-química de produtos lácteos: estudo exploratório de comparação dos resultados obtidos por metodologia oficial e por ultra-som. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, São Paulo, v. 43, n. 4, p. 607-613, 2007.

YOON, Y.; LEE, S.; CHOI, K. H. Microbial benefits and risks of raw milk cheese. *Food Control*, Reading, v. 63, n. 1, p. 201-215, 2016.

ZAFALON, L. F.; NADER FILHO, A.; OLIVEIRA, J. V.; RESENDE, F. D. Comportamento da condutividade e do conteúdo de cloretos do leite como métodos auxiliares de diagnóstico na mastite subclínica bovina. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, Rio de Janeiro, v. 25, n. 3, p. 159-163, 2005.