

**LIGA DE ENSINO DO RIO GRANDE DO NORTE
FACULDADE NATALENSE PARA O DESENVOLVIMENTO
DO RIO GRANDE DO NORTE**

LUCIANA VILLAR DE MELLO

**ANÁLISE MICROBIOLÓGICA DE QUEIJO DE MANTEIGA COMERCIALIZADO
EM UMA REGIÃO ADMINISTRATIVA DE NATAL - RN**

**NATAL/RN
2009**

LUCIANA VILLAR DE MELLO

**ANÁLISE MICROBIOLÓGICA DE QUEIJO DE MANTEIGA COMERCIALIZADO
EM UMA REGIÃO ADMINISTRATIVA DE NATAL – RN**

Monografia apresentada ao Curso de Graduação em Nutrição da Faculdade Natalense para o Desenvolvimento do Rio Grande do Norte, como parte dos requisitos para obtenção do Grau de Nutricionista.

Orientadora: Prof. Monique Silveira Rosa (Msc.)

**NATAL/RN
2009**

LUCIANA VILLAR DE MELLO

**ANÁLISE MICROBIOLÓGICA DE QUEIJO DE MANTEIGA COMERCIALIZADO
EM UMA REGIÃO ADMINISTRATIVA DE NATAL – RN**

Monografia apresentada ao Curso de Graduação em Nutrição da Faculdade Natalense para o Desenvolvimento do Rio Grande do Norte, e aprovada em 09 de Dezembro de 2009, pela banca examinadora:

Monique Silveira Rosa, (M. SC)
Orientadora

Valtêmia Porpino (Prof.)
Membro

Elaine
Membro

Dedico este a todos que amo e fizeram e fazem até hoje parte da longa estrada da minha vida... A todos que acreditaram em mim, no meu esforço e dedicação durante estes quatro anos de estudo. E principalmente a minha mãe e meu pai (em memória) que me proporcionaram uma realização de um sonho, deles e meu, de me tornar A Nutricionista.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a **Deus** por ter me dado saúde e a oportunidade de estudar e de me tornar um alguém nesta vida, agradeço a ele também por ter me dado uma pequena família que é maravilhosa, e que apesar de pequena possui demonstrações enormes de carinho e junto a ela que fiz e faço a caminhada para o meu futuro, que se Deus quiser será brilhante.

Em especial a minha mãe **Ana Maria** a quem amo muito e devo tudo o que sou a ela, pois mesmo com tantas dificuldades e empecilhos, procurou fazer o melhor para garantir um futuro melhor do que o dela pra mim, sem ela o sonho não teria sido concretizado. O meu muito obrigada. Amo-te! Ao meu irmão de coração Júlio César, que mesmo sem compartilhar a minha vida acadêmica com ele, esteve sempre a postos para me ajudar.

Tenho certeza que neste momento estou sendo motivo de orgulho para pessoas especiais que não estão mais aqui na terra, meus avós **Aldair** e **Bernadete**, e meu pai **Roberto**, mais que lá de cima torcerão por mim. Vocês sempre estarão ao meu lado, em meu coração.

Agradeço a todos os meus **amigos**, que de certa forma sempre estiveram ao meu lado, me apoiando; a minhas companheiras de laboratório, **Keyla Suerda**, **Candice Lima** e **Marcela Dutra**, que sempre me ajudaram, tiraram dúvidas, enfim, compartilhamos esses últimos momentos juntas que por sinal foram ótimos, o meu sincero agradecimento.

Ao meu “anjo”, que não caiu do céu, **Jackson Costa**, pela paciência, pelo carinho e amor, pelo ombro amigo nas horas de estresse total, pela força e dedicação, por ser o namorado perfeito, te agradeço por tudo, não haveria melhor hora para você entrar em minha vida.

E claro, agradeço em especial a minha orientadora **Monique Rosa**, pela paciência, calma (até demais) e dedicação ao meu trabalho. Agradeço a todos **os professores** que fizeram parte da minha vida na escola e faculdade, pois também sem a ajuda deles eu não teria conseguido chegar até aqui.

A todos: muito **Obrigada** por tudo, que Deus guarde para nós um futuro brilhante e cheio de realizações.

“Todos temos o direito de saber a qualidade do que comemos, pois o alimento é uma de nossas fontes de vida!”

Luciana Villar de Mello

RESUMO

O consumo de produtos regionais tais como queijos de coalho, e de manteiga e manteiga da terra é tradicional e muito difundido entre a população nordestina, tornando-se importante um alerta para a qualidade dos produtos e processos. O leite, principal matéria-prima para elaboração destes produtos, na maioria das vezes não é obtido nas condições higiênicas necessárias, resultando produtos de baixa qualidade perdendo a competitividade no mercado interno e não se adequando às normas vigentes de boas praticas de fabricação. Além da falta de controle de qualidade da matéria-prima, o processamento desses produtos, não se encontra bem definido, o que leva a falta de padronização dos queijos de coalho, manteiga e manteiga da terra comercializados. Este trabalho tem como objetivos verificar a presença de microorganismos, além de observar e analisar as condições higiênico-sanitárias da forma de armazenamento e comercialização do produto.

Foram analisadas 20 amostras, de quatro locais diferentes, de queijo de manteiga, coletadas em pontos distintos na cidade de Natal, na qualidade de consumidor. As análises realizadas foram a determinação do Número Mais Provável (NMP) de coliformes a 45° C, através da técnica dos tubos múltiplos, a presença de *Staphylococcus coagulase positiva*, através da prova de coagulase positiva e a pesquisa de *Salmonella Sp.*, com as provas de identificação: hidrólise da uréia, degradação do malonato, teste do vermelho de metila (VM) e Voges-Proskauer (VP) e o teste do citrato. A metodologia aplicada na pesquisa foi de acordo com as normas do International Commission on Microbiological Specification (ICMSF, 1978).

Das 20 amostras de queijo de manteiga analisadas, 10% apresentaram contaminação por bactérias do grupo coliformes à 45°C, 15% contaminação por *Staphylococcus coagulase positiva* e ausência de *Salmonella sp.* em todas as amostras.

Portanto conclui-se que o queijo de manteiga analisado é impróprio para o consumo, por apresentar 10% das amostras com índice de contaminação por *Coliformes a 45°C*, e 15% das amostras com contaminação de *Staphylococcus coagulase positiva*, e ausência de *Salmonella sp.*, desta forma sugere-se maiores cuidados na manipulação, com a utilização das Boas Práticas de Fabricação, do queijo de manteiga desde o início do processamento pelos fabricantes até a conservação e distribuição final do queijo de manteiga pelos comerciantes.

Palavras chave: Qualidade. Queijo. Análise. Contaminação.

ABSTRACT

The consumption of regional products such as curdle cheeses, cheese of butter and butter of the land traditional and is very spread out between the population northeastern, becoming important alert for the process and product quality. Milk, main raw material for elaboration of these products, is most of the time not gotten in the necessary hygienical conditions, resulting products of low quality losing the competitiveness in the domestic market and if adjusting to the effective norms of good you do not practice of manufacture. Beyond the lack of quality control of the raw material, the processing of these products, if does not find clear-cut, what it takes the lack of standardization of the curdle cheeses, butter and commercialized butter of the land. This work has as objective to verify the presence of microorganisms, beyond observing and analyzing the hygienical-sanitary conditions of the storage form and commercialization of the product. 20 samples had been analyzed, of four different places, cheese of butter, collected in distinct points in the city of Natal, in the quality of consumer. The carried through analyses had been the determination of Most likely number (NMP) of *Coliformes 45° C*, through the technique of the multiple pipes, the presence of positive *Staphylococcus coagulase*, through the positive test of coagulase and the research of *Salmonella sp.*, with the tests of identification: hydrolysis of the urea, degradation of the malonato, test of the red of metila (VM) and Voges-Proskauer (VP) and the test of the citrate. The methodology applied in the research was in accordance with the norms of the International Commission on Microbiological Specification (ICMSF, 1978). Of the 20 samples of analyzed cheese of butter, 10% had presented contamination for *Coliformes* bacteria of the group to 45°C, 15% contamination for positive *Staphylococcus coagulase* and absence of *Salmonella sp.* in all the samples. Therefore one concludes that the analyzed cheese of butter is improper for the consumption, for presenting 10% of the samples with index of contamination for *Coliformes 45°C*, and 15% of the samples with contamination of positive *Staphylococcus coagulase*, and absence of *Salmonella sp.*, in such a way suggests bigger cares in the manipulation, with the use of Good the Practical ones of Manufacture, of the butter cheese since the beginning of the processing for the manufacturers until the conservation and final distribution of the cheese of butter for the traders.

Words key: Quality. Cheese. Analysis. Contamination.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: Fluxograma da coleta das amostras para as análises microbiológicas do queijo de manteiga.

Figura 2 – Fluxograma da determinação do NMP de coliformes a 45°C em queijo de manteiga.

Figura 3: Fluxograma da contagem de *Staphylococcus coagulase* positiva em queijo de manteiga.

Figura 4 - Fluxograma de Contagem de *Salmonella sp.* em queijos de manteiga.

Gráfico 1 – Classificação quanto à presença de microrganismos do tipo coliformes a 45°C nas amostras de Queijo de Manteiga Comercializadas em Natal-RN, 2009.

Gráfico 2 - Classificação quanto a presença de microrganismos do tipo *Salmonella sp.* nas amostras de Queijo de Manteiga Comercializadas em Natal-RN, 2009.

Gráfico 3 - Classificação quanto à presença de microrganismos do tipo *Staphylococcus* nas amostras de Queijo de Manteiga Comercializadas em Natal-RN, 2009.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Contagem do número mais provável de *Coliformes* a 45°C das amostras de queijo de manteiga.

Tabela 2: Resultados da prova da coagulase para *Staphylococcus coagulase* positiva.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	03
2. OBJETIVOS	05
2.1. OBJETIVO GERAL	05
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	05
3. REFERENCIAL TEÓRICO	06
3.1 LEITE	06
3.2 QUEIJO	07
3.3 CRESCIMENTO MICROBIANO	08
3.4 CONTAMINAÇÃO DE ALIMENTOS	12
3.5 POSSÍVEIS MICRORGANISMOS PRESENTES EM QUEIJOS	14
3.5.1 Microrganismos Indicadores	15
3.5.1.1 <i>Coliformes</i> a 45°C	15
3.5.2 Microrganismos Patogênicos	16
3.5.2.1 <i>Salmonella sp.</i>	17
3.5.2.2 <i>Staphylococcus coagulase</i> positiva	18
4 METODOLOGIA	20
4.1 TIPO DE ESTUDO	20
4.2 MATERIAL	20
4.2.1 AMOSTRAGEM	20
4.3 MÉTODOS	21
4.3.1 Preparação das Amostras	21
4.3.2 Análises Realizadas	21
4.3.2.1 Determinação de coliformes à 45°C	21
4.3.2.2 Contagem de <i>Staphylococcus coagulase</i> positiva	23
4.3.2.3 Pesquisa de <i>Salmonella sp.</i>	25
4.4 PADRÃO MICROBIOLÓGICO DE COMPARAÇÃO	28
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	29
6 CONCLUSÃO	35
REFERÊNCIAS	37

1. INTRODUÇÃO

O consumo de produtos regionais tais como queijos de coalho, queijo de manteiga e manteiga da terra é tradicional e muito difundido entre a população nordestina, tornando-se importante um alerta para a qualidade dos produtos e processos (ARAÚJO; NASSU, 2002).

Entende-se por queijo o produto fresco ou maturado que se obtém por separação parcial do soro do leite ou leite reconstituído (integral, parcial ou totalmente desnatado), ou de soros lácteos, coagulados pela ação física do coalho, de enzimas específicas, de bactéria específica, de ácidos orgânicos, isolados ou combinados, todos de qualidade apta para uso alimentar, com ou sem agregação de substâncias alimentícias e/ou especiarias e/ou condimentos, aditivos especificamente indicados, substâncias aromatizantes e matérias corantes. Entende-se por queijo fresco o que está pronto para consumo logo após sua Fabricação; por queijo maturado o que sofreu as trocas bioquímicas e físicas necessárias e características da variedade do queijo (BRASIL, 1996).

A denominação queijo está reservada aos produtos em que a base láctea não contenha gordura e/ou proteínas de origem não láctea (BRASIL, 1996).

Do ponto de vista calórico, pode-se afirmar que se trata de alimentos com alta concentração calórica, especialmente os chamados queijos semiduros e duros. Nestes tipos, desaparece a lactose, significando que, nos casos de intolerância a ela, o queijo pode substituir o leite (SALINAS, 2002).

O leite, principal matéria-prima para elaboração destes produtos, na maioria das vezes não é obtido nas condições higiênicas necessárias, resultando produtos de baixa qualidade perdendo a competitividade no mercado interno e não se adequando às normas vigentes de boas práticas de fabricação. Além da falta de controle de qualidade da matéria-prima, o processamento desses produtos, não se encontra bem definido, o que leva a falta de padronização dos queijos de coalho, manteiga e manteiga da terra comercializados (ARAÚJO; NASSU, 2002).

A comercialização de alimentos de origem animal em feiras livres, expostos em barracas sem refrigeração, sem proteção contra poeira e insetos, pode alterar sua qualidade. No caso particular dos queijos que, em geral, são vendidos em pedaços, há o perigo de incorporar, externamente, matérias estranhas de origem biológica (como insetos e ácaros) ou não (como terra), por falhas de manipulação do

produto durante a venda a retalho, pela higienização precária das bancas e dos utensílios utilizados pelos feirantes, ou mesmo, por contaminação cruzada entre os produtos expostos (CORREIA; RONCADA, 1997).

A produção, preparação, distribuição, armazenagem e comercialização de produtos alimentícios, com segurança, são atividades de extrema importância que exigem cuidados especiais com o ambiente de trabalho, com equipamentos e utensílios, com alimentos propriamente ditos, com os manipuladores de alimentos, com instalações sanitárias e com o controle de pragas, entre outros, para a prevenção da contaminação alimentar (SOUZA, 2006).

Com isso, a análise da qualidade microbiológica do queijo de manteiga, como produto regional, comercializados numa área administrativa do município de Natal-RN, se faz de extrema importância para a saúde da população, tendo em vista que este é um produto que tem sido cada vez mais consumido. A não existência de microrganismos ou material estranho neste alimento torna-se um fator importante para a saúde da população e servi como base de outras pesquisas.

2-. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL

Avaliar a qualidade microbiológica do queijo de manteiga comercializado em uma região administrativa de Natal-RN.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar a contagem do NMP/25g de *Coliformes a 45°C*;
- Verificar a presença de *Salmonella sp* nas amostras de queijo de manteiga;
- Pesquisar a bactéria *Staphylococcus coagulase positiva* no queijo de manteiga.

3-. REFERENCIAL TEÓRICO

3.1. LEITE

Do ponto de vista físico-químico, o leite é uma mistura homogênea de grande número de substâncias (lactose, glicérides, proteínas, sais, vitaminas, enzimas, etc.), dos quais algumas estão em emulsão (as gorduras e as substâncias associadas), algumas em suspensão (as caseínas ligadas a sais minerais) e outras em dissolução verdadeira (lactose, vitaminas hidrossolúveis, proteínas do soro, sais, etc.) (ORDOÑEZ, 2005).

O leite é considerado o mais completo alimento, possuindo elevado valor biológico na alimentação humana, particularmente nos primeiros estágios da vida, quando se constitui em alimento exclusivo. Os elementos nutricionais, sobretudo proteínas, carboidratos, vitaminas e minerais contidos no leite, transformam-no em um excelente substrato para o crescimento de microrganismos (GERMANO; GERMANO 2008). Além disso, é largamente utilizado para o preparo de derivados, os quais mantêm em sua composição praticamente todos os componentes nutritivos do leite. Para o preparo desses derivados, a matéria prima deve ser obtida em condições higiênico-sanitárias ideais e ser resfriado logo após sua obtenção, pois sem esses cuidados a qualidade final do produto pode ser afetada (ALBUQUERQUE; RODRIGUES, 2008).

No leite encontram-se todas as vitaminas e muitos minerais. Esse alimento é uma excelente fonte de cálcio, riboflavina, vitamina B₁₂, tiamina e vitamina A, mas é deficitário, sobretudo em vitamina D, folato e ferro.

As mais importantes proteínas no soro do leite de vaca são a α – lactoalbumina e a β – lactoglobulina. Em relação à α – lactoalbumina, sua função biológica é perfeitamente conhecida, fazendo parte do sistema enzimático, responsável pela síntese da lactose.

Tradicionalmente, considera-se que a lactose favorece a retenção de Ca, e por isso estimula a ossificação e previne a osteoporose.

Os sais majoritários do leite são fosfatos, citratos e cloretos, sulfatos e carbonatos de sódio, potássio e magnésio (ORDOÑEZ, 2005).

O magnésio atua nas células de todos os tecidos moles, onde faz parte do mecanismo de síntese protéica e é necessário para liberação de energia. Junto com

o cálcio participa da contração e do relaxamento muscular. Além disso, o cálcio participa da formação óssea e dentária (SIZER, 2003).

Apesar da complexidade do mercado consumidor, determinada pela flutuação da demanda, a atividade de produção artesanal de derivados de leite (sobretudo o queijo) proliferou amplamente, atingindo elevadas proporções nos dias atuais na forma de pequenas fábricas com instalações precárias. Como resultado desta situação, formou-se um contingente populacional significativo envolvido com a produção do queijo minas que não consegue se inserir no mercado sem inspeção sanitária, que exigem ações específicas dos serviços de vigilância, já que podem representar riscos importantes aos consumidores (GERMANO; GERMANO, 2008).

3.2. QUEIJO

O queijo de manteiga, também conhecido como “requeijão do nordeste”, sabe-se que é produzido em maior escala principalmente nos estados de Alagoas, Sergipe, Pernambuco, Paraíba e Rio Grande do Norte. Diferentemente do queijo de coalho, este produto é obtido sem uso do coalho, já que a coalhada é obtida por desnaturação ácida (ARAÚJO; NASSU, 2002).

Queijo de manteiga ou requeijão do nordeste é uma massa de caseína (de leite desnatado e dessorado), lavada e filiada sob ação do calor e adicionada de gordura láctea (manteiga fundida). Alguns queijeiros resolveram baratear o produto mediante a substituição total ou parcial da gordura láctea por óleo vegetal, descaracterizando o produto original (RIBEIRO, 1958).

Segundo o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade deste produto, define-se o queijo de manteiga como o produto obtido mediante coagulação do leite com emprego de ácidos orgânicos de grau alimentício, cuja massa é submetida à dessoragem, lavagem e fusão à temperatura de aproximadamente 85°C, com acréscimo exclusivamente de manteiga de garrafa ou manteiga da terra ou manteiga do sertão (5%) (BRASIL, 2001).

A tecnologia de fabricação do queijo de manteiga é totalmente empírica e seu processamento ainda é artesanal, apresentando deficiências tecnológicas durante as fases de fabricação, armazenamento e distribuição e grande variação na composição química (CAVALCANTE; COSTA, 2005). O produto é geralmente apresentado em formato de paralelepípedo, entre 2,0 a 10,0 kg.. De acordo com o teor

de gordura no extrato seco pode-se classificar o queijo de manteiga como “semigordo” a “gordo” e, de acordo com o teor de umidade, de “média” a “alta” umidade, seguindo classificação para queijos do Ministério da Agricultura (BRASIL, 1996).

O queijo por apresentar características nutritivas que o tornam um alimento muito importante para nos seres humanos, torna-o também, uma ótima fonte de nutrientes para o crescimento de microrganismos, inclusive microrganismos patogênicos (SILVA; CARVALHO; LIMA, 2008).

O queijo é uma das formas mais antigas de conservação do leite, pois surgiu praticamente com a domesticação de animais produtores de leite.

A pecuária de leite, associada à fabricação de queijos com venda direta ao consumidor em feiras-livres, surge como uma das alternativas adotadas pelos pequenos agricultores como forma de agregar valor a sua produção e aumentar a receita de sua atividade. Na maioria das vezes estes produtos são elaborados a partir de leite sem qualquer tratamento térmico, com condições higiênico-sanitárias duvidosas (obtido sem higiene), o que leva à produção de um derivado de qualidade inferior, senão potencialmente capaz de comprometer a saúde de seus consumidores (ALBUQUERQUE; RODRIGUES, 2008).

3.3. CRESCIMENTO MICROBIANO

Quando falamos de crescimento microbiano nos referimos ao número e não ao tamanho das células. Os microrganismos em crescimento estão, na verdade, aumentando seu número e se acumulando em colônias (grupos de células que podem ser visualizadas sem a utilização de um microscópio) que contêm milhares de células ou populações que agrupam bilhões de células. Em geral, não nos preocupamos com o crescimento de uma única célula. Apesar de cada célula ser capaz de dobrar aproximadamente de tamanho, esta alteração pode ser considerado insignificante quando comparamos com as alterações de tamanho observadas durante o desenvolvimento dos animais e das plantas (TORTORA; FUNKE; CASE, 2000).

Quando os alimentos são de origem vegetal e animal, faz-se necessário considerar as características dos tecidos vegetais e animais que afetam o desenvolvimento de microrganismos. Tanto as plantas quanto os animais

apresentam evoluídos mecanismos de defesa contra a invasão e proliferação de microrganismos, sendo que alguns deles permanecem eficientes quando transformados em alimentos frescos. O conhecimento e o uso efetivo de cada um desses fenômenos naturais podem auxiliar a prevenir ou retardar o processo de deterioração dos alimentos mediado por microrganismos (GERMANO; GERMANO 2008).

Os microrganismos necessitam de condições apropriadas para sua reprodução e sobrevivência. O conhecimento dos fatores que favorecem ou inibem a sua multiplicação é fundamental para uma melhor compreensão dos princípios básicos que regem a alteração e a conservação dos alimentos. Alguns desses fatores são intrínsecos, ou seja, características inerentes aos alimentos, como a atividade de água, o pH, o potencial de óxido redução, a composição química, a presença de nutrientes ou de fatores antimicrobianos naturais e a microbiota do alimento. Outros são extrínsecos, ou seja, características e/ou condições do meio ambiente no qual o alimento se encontra, como temperatura, a atmosfera e a umidade relativa. Os fatores que tem maior impacto sobre o crescimento microbiano nos alimentos são: a atividade de água, o pH e a temperatura (SILVA et al, 2007).

A atividade de água (a_w) da maioria dos vegetais está acima de 0,99. Em geral, as bactérias exigem valores mais elevados de a_w do que os fungos, já as bactérias Gram-negativas são mais exigentes que as Gram-positivas. As maior parte das bactérias deteriorantes não se desenvolvem abaixo de $a_w = 0,91$, enquanto os bolores deteriorantes podem desenvolver-se até $a_w = 0,80$ (GERMANO; GERMANO, 2008).

Existem algumas relações entre a_w , à temperatura e nutrição. Primeiro, a qualquer temperatura, a capacidade de crescimento dos microrganismos diminui com a redução de a_w . Segundo, o intervalo de a_w , no qual os microrganismos crescem é maior na sua temperatura ótima de crescimento. Terceiro, a presença de nutrientes aumenta o intervalo de atividade de água no qual os microrganismos sobrevivem (JAY, 2005, p. 75).

A acidez ou a alcalinidade de um meio tem grande influencia na estabilidade de macromoléculas, como enzimas, o que influi tanto no crescimento como no metabolismo dos microrganismos (GERMANO; GERMANO, 2008). Já está bem-estabelecido que a maioria dos microrganismos crescem melhor com valor de pH em torno de 7,0 (6,6 – 7,5), apesar de alguns poucos crescerem em pH abaixo de 4,0.

As bactérias tendem a ser mais exigentes em termos de pH do que os mofo e as leveduras, sendo as bactérias patogênicas ainda mais exigentes (JAY, 2005).

A faixa de pH é definida pelo valor mínimo (no final ácido da escala) e pelo valor máximo (no final básico da escala). Cada microrganismo possui um valor ótimo de pH, onde ocorre o seu crescimento máximo (FORSYTHE, 2005).

O potencial de oxidação-redução (Eh), ou potencial redox pode ser definido como a facilidade com que o substrato pode ganhar (redução) ou perder (oxidação) elétrons. A alteração do valor entre os agentes oxidantes e redutores determina o Eh de uma cultura bacteriana (GERMANO; GERMANO 2008).

O potencial de Eh de um alimento é determinado pelos seguintes parâmetros: as características de Eh do alimento original; a capacidade de balanceamento, isto é, a resistência do alimento em modificar o seu Eh; a tensão de oxigênio da atmosfera em contato com o alimento; e o acesso que a atmosfera tem ao alimento (JAY, 2005).

Como fonte de energia, os microrganismos dos alimentos utilizam açúcares, álcoois e aminoácidos. Alguns microrganismos são capazes de utilizar carboidratos complexos, como amido e celulose, como fonte de energia, degradando-os a açúcares simples. (JAY, 2005). As fontes primárias de nitrogênio são os aminoácidos. Dentre as vitaminas, alguns microrganismos requerem pequenas quantidades de vitamina B, facilmente encontrada na maior parte dos alimentos. As bactérias Gram-negativas e os bolores são capazes de sintetizar a maioria ou mesmo todos os compostos necessários ao seu desenvolvimento, podendo, portanto, desenvolver-se nos alimentos com baixos teores de vitamina B (GERMANO; GERMANO, 2008).

A estabilidade de alguns alimentos diante do ataque de microrganismos deve-se à presença de certas substâncias naturais que mostraram ter atividade antimicrobiana. Algumas espécies são conhecidas por possuir óleos essenciais com atividade antimicrobiana (JAY, 2005). O leite de vaca contém várias substâncias antimicrobianas, como lactoferrina, congulinina e lactoperoxidase. A própria caseína do leite e alguns ácidos graxos livres têm desempenhado ação antimicrobiana sob determinadas situações.

A cobertura natural de alguns alimentos constitui excelente barreira física contra a entrada de microrganismos e posterior dano causado pela ação deteriorante

destes seres, como os tegumentos das sementes e as cascas das frutas, das nozes e dos ovos, entre outros.

Dentre os inúmeros parâmetros extrínsecos que favorecem a multiplicação ou crescimento de microrganismos, a temperatura ocupa lugar de destaque. O conhecimento do fator temperatura é imprescindível para a avaliação dos riscos que os alimentos podem oferecer à saúde. Os microrganismos podem se desenvolver em temperaturas que variam de 2 a 70°C, contudo já se constatou multiplicação a temperaturas extremas como -35°C ou próximos a 100°C. De acordo com suas exigências de temperatura, microrganismos são classificados como: psicrófilos, psicrotróficos, mesófilos e termófilos (GERMANO; GERMANO, 2008).

Os microrganismos psicrófilos têm uma temperatura ótima entre 10°C e 15°C, os mesófilos têm temperatura ótima entre 25°C e 40°C e os termófilos têm temperatura ótima entre 45°C e 65°C (LANDGRAF; FRANCO, 2005).

A maioria dos microrganismos cresce bem nas temperaturas ideais para os seres humanos, no entanto, certas bactérias são capazes de crescer em temperaturas extremas, onde a maioria dos organismos eucarióticos não sobreviveria. A maioria dos microrganismos cresce dentro de variações limitadas de temperatura, sendo que a temperatura máxima e mínima de crescimento pode-se distanciar somente em 30°C. Estes microrganismos não apresentam um bom crescimento nas temperaturas extremas considerando sua faixa de crescimento.

O método mais comumente utilizado na preservação dos alimentos é a refrigeração. Este método tem como base o fato de a velocidade de reprodução dos microrganismos diminuir em baixas temperaturas. Os microrganismos podem sobreviver em temperaturas próximas ao congelamento (podem permanecer dormentes), mas gradualmente eles diminuem seu número. Algumas espécies diminuem seu número de células mais rapidamente que outras (TORTORA; FUNKE; CASE, 2000).

A umidade relativa (UR) do meio de armazenamento é importante tanto sob o ponto de vista de atividade de água (a_w) no interior dos alimentos como do crescimento de microrganismos sobre sua superfície. Quando a a_w de um alimento é de 0,6, é importante que ele seja estocado sob condições de UR que não permitam que o alimento absorva umidade do ar e, dessa forma, aumente a a_w de sua superfície a um ponto tal que possibilite o crescimento microbiano (JAY, 2005).

A composição gasosa do ambiente influencia no tipo de microrganismo que possa existir em um alimento. Quando ocorre a presença de oxigênio, os microrganismos que se desenvolvem são os aeróbicos, já na ausência de Oxigênio ocorre o desenvolvimento predominante de microrganismos anaeróbicos.

O grau e o número das modificações por microrganismos variam segundo a composição dos alimentos e as características dos microrganismos atuantes.

O aspecto dos alimentos, que representa a soma dos demais caracteres organolépticos, se modifica visivelmente por alterações de sua forma, de seu volume e superfície.

A cor de numerosos alimentos é modificada pela presença de bactérias pigmentadas, de mofos de diferentes matizes e por alterações principalmente putrefativas que atingem a parte externa ou o interior dos produtos.

As qualidades flavorizantes atingidas por bactérias, leveduras e fungos se anulam tão intensamente que o alimento se torna impróprio para o consumo.

De acordo com o germe deteriorante e a intensidade de seu crescimento a consistência e a textura do alimento alterado muitas vezes ficam profundamente prejudicadas (EVANGELISTA, 2005).

3.4. CONTAMINAÇÃO EM ALIMENTOS

As doenças microbianas do sistema digestório perdem somente para as doenças respiratórias como causas de doenças no EUA. A maioria destas doenças resulta da ingestão de alimentos ou água contaminados com microrganismos patógenos ou suas toxinas. Estes patógenos geralmente penetram no aumento ou suprimento de água após ser disseminados nas fezes de pessoas ou animais infectados com eles. Assim, as doenças microbianas do sistema digestório são tipicamente transmitidas por um ciclo fecal-oral (TORTORA; FUNKE; CASE, 2000).

Micróbios transientes ou residentes entram e saem continuamente do trato gastrointestinal. A maioria dos microrganismos ingeridos com os alimentos é destruída no estômago e duodeno pelo baixo pH, e seu crescimento é inibido no intestino delgado pela microbiota residente. Eles são então eliminados do cólon durante a defecação juntamente com um grande número de micróbios endógenos (BURTON; ENGELKIRK, 1998).

O ciclo é apenas interrompido por práticas de saneamento efetivos e responsáveis no manuseio do alimento e por métodos modernos de tratamento de efluentes e desinfecção da água potável (TORTORA; FUNKE; CASE, 2000).

Alimentos contaminados são um excelente meio para o crescimento de patógenos. Muito frequentemente, a falta de cuidado – tal como a não obediência as precauções quando se trabalha com material fecal, a presença de moscas e outros insetos, a poeira, a sujeira e os animais domésticos, assim como a falta de lavagem das mãos - é responsável por esta forma de contaminação (BURTON; ENGELKIRK, 1998).

Apesar do alto nível de segurança dos produtos alimentícios fornecidos para consumo, os perigos e riscos microbiológicos continuam existindo, resultando em números expressivos nas estatísticas de incidência de enfermidades transmitidas por alimentos.

Todos os alimentos destinados ao consumo humano, dos vegetais as mais refinadas iguarias de origem animal como o caviar e os queijos, raramente são obtidos em estado estéril ou descontaminado.

As doenças transmitidas por alimentos (DTAs) são, indistintamente, referidas como envenenamentos alimentares, sejam causadas por agentes biológicos ou químicos (GERMANO; GERMANO 2008).

Segundo SILVA JR. (1995), se admite quatro divisões para doenças transmitidas por alimento:

- **Toxinose**

Quadro clínico consequente a ingestão de toxinas bacterianas pré-formadas nos alimentos, decorrente da multiplicação de bactérias toxinogênicas nos alimentos, como o *Staphylococcus aureus*, *Clostridium botulinum* e *Bacillus cereus* emético;

- **Infecção**

Quadro clínico decorrente da ingestão de microrganismos patogênicos que se multiplicam no trato gastrointestinal, produzindo toxinas ou agressão ao epitélio, como a *Salmonella sp.*, *Escherichia coli* patogênica, *Vibrios* patogênicos, etc;

- **Toxinfecção**

Quadro clínico decorrente da ingestão de quantidades aumentadas de bactérias na forma vegetativa que liberam toxinas no trato gastrointestinal ao esporular, porém sem colonizar, como o *Clostridium perfringens* e *Bacillus cereus* Clássico;

- **Intoxicação Química**

Quadro clínico decorrente da ingestão de substâncias químicas nos alimentos, como agrotóxicos, pesticidas, raticidas, metais pesados, micotoxinas (toxinas de fungos), toxinas de algas, aminas biogênicas, aminas vasopressoras alergênicas (produzidas por microrganismos psicrotróficos), etc.

A transmissão é feita pelo próprio homem direta ou indiretamente, se estiver doente ou se for portador sã. Nesta cadeia epidemiológica, o alimento é um carreador de contaminação, que por sua vez pode receber uma contaminação diretamente das vias de eliminação do homem e dos animais; pode receber também os microrganismos patogênicos do homem indiretamente através dos artrópodes ou vetores, que possam levar a contaminação do lixo ou do ambiente contaminado; ou ainda, os alimentos podem receber uma contaminação presente no solo (terra), água e ar, sem a presença do ser humano (SILVA JR. 1995).

Os queijos, assim como os outros alimentos, segundo SILVA JR. (1995), devem estar isentos de matérias estranhas como pedaços de vidro, madeira, prego, parafuso, fragmentos de insetos, terra, fungos, areia, etc.

3.5. POSSÍVEIS MICRORGANISMOS PRESENTES EM QUEIJOS

A resolução RDC nº12 de 02 de janeiro de 2001 (BRASIL, 2001), recomenda que os microrganismos a serem pesquisados em queijos de manteiga sejam os microrganismos *Coliformes* a 45°C, *Staphylococcus coagulase positiva*, *Listeria monocytogenes* e *Salmonella* sp.

3.5.1. Microrganismos Indicadores

O termo microrganismo indicador pode ser aplicado a qualquer grupo taxonômico, fisiológico ou ecológico de microrganismos, cuja presença ou ausência proporciona uma evidência indireta referente a uma característica particular do histórico da amostra (FORSYTHE, 2005). São grupos ou espécies de microrganismos que, quando presentes em um alimento, podem fornecer informações sobre a ocorrência de contaminação de origem fecal, sobre a provável presença de patógenos ou sobre a deterioração potencial do alimento, além de poderem indicar condições sanitárias inadequadas durante o processamento, produção ou armazenamento (LANDGRAF; FRANCO, 2005).

Normalmente, é associado a microrganismos de origem intestinal, porém outros grupos podem ser usados como indicadores em determinadas situações (FORSYTHE, 2005).

3.5.1.1. Coliformes a 45°C

Os coliformes são bastonetes Gram-negativos, não esporulados, que fermentam a lactose dentro de 48 horas e produzem colônias escuras com brilho metálico em ágar tipo Endo. De forma geral, os coliformes são representados por quatro gêneros da família enterobacteriaceae: *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Escherichia* e *Klebsiella* (JAY, 2005).

Visto que a *Escherichia coli* é melhor indicador de contaminação fecal que os outros gêneros e espécies citados, é desejável a determinação de sua incidência em uma população de coliformes (JAY, 2005).

Coliformes fecais produzem ácidos e gás em caldo EC em temperaturas entre 44°C e 46°C, usualmente a 44,5°C ou 45,5°C. (GERMANO; GERMANO, 2008). Assim como muitas outras bactérias gram-negativas não patogênicas, os coliformes crescem bem em uma ampla variedade de meios e em muitos alimentos (JAY, 2005). Eles foram descritos crescendo em temperaturas tão baixas quanto -2°C e tão altas quanto 50°C. Em alimentos, o crescimento é pobre ou muito lento a 5°C, embora vários pesquisadores tenham demonstrado o crescimento de coliformes em temperaturas de 3°C a 6°C. Crescem bem em ágar nutriente e produzem colônias visíveis dentro de 12 a 16 horas a 37°C (JAY, 2005). O pH

próximo do neutro propicia condições ótimas para o desenvolvimento da *E. coli*, a temperatura ótima de 37°C (8 a 44-45°C), embora possa sobreviver até 9 meses a -20°C, em carne moída, e resistir até 68°C; o pH ótimo de 7,5, apesar de apresentar grande tolerância a variações (GERMANO; GERMANO, 2008).

Ao contrário de muitas outras bactérias, os coliformes têm a capacidade de fermentar a lactose com produção de gás, sendo esta única característica suficiente para determinação presuntiva. Em geral a facilidade com que os coliformes podem ser cultivados e diferenciados torna-os praticamente indicadores ideais, exceto pela dificuldade de identificação de linhagens atípicas (JAY, 2005).

O mecanismo de contaminação é por via oral, principalmente através da água e alimentos, conservados em precárias condições higiênicas, capazes de permitir seu contato com material de origem fecal.

Indivíduos infectados também são fontes de contaminação, localizadas em suas mãos e indumentária (EVANGELISTA, 2005).

A infecção tem período médio de incubação de 36 horas (17 a 72 horas) e caracterizam-se por diarreia aquosa com grande quantidade de muco, náuseas, dores abdominais, vômitos, cefaléia, febre e arrepios. Não é comum a ocorrência de diarreia com sangue.

A prevenção e o controle passam obrigatoriamente pela higiene do abate e da ordenha; pela conservação das matérias-primas abaixo dos 7°C; pela pasteurização dos produtos lácteos e sucos de frutas; pela adoção das boas práticas de fabricação e pela análise de perigos e pontos críticos de controle nas indústrias; pelos cuidados na manipulação de alimentos de origem animal cru; pela higiene de instalações e equipamentos nas cozinhas; pelo tratamento térmico dos alimentos cárneos e pelo resfriamento rápido dos alimentos processados abaixo de 7°C (GERMANO; GERMANO, 2008).

3.5.2. MICRORGANISMOS PATOGÊNICOS

Os microrganismos patogênicos estão presentes no solo e, consequentemente, nas colheitas, no gado, nas aves e nos peixes. Portanto, é inevitável que produtos crus utilizados como ingredientes carreguem contaminação patogênica (FORSYTHE, 2005).

3.5.2.1. *Salmonella sp*

As salmonelas são bacilos Gram-negativos, não formadores de esporos, anaeróbios facultativos, catalase positivos, oxidase negativos, redutores de nitratos a nitritos e, geralmente, móveis com flagelos peritríquios, com exceção da *S.gallinarum* e da *S. pullorum*, pertencentes à família *Enterobacteriaceae*. Não são organismos exigentes, podendo multiplicar-se em diversas condições ambientais externas aos seres vivos. Desenvolvem-se facilmente em alimentos, assim como em águas contaminadas com restos de alimentos ou fezes (SILVA JR, 1995). Agente muito comum de intoxicação alimentar, especialmente causada pela ingestão de aves domésticas contaminadas (BURTON; ENGELKIRK, 1998). Multiplicam-se em temperaturas entre 7 a 49,5°C, sendo 37°C a temperatura ótima para desenvolvimento. Em 4 horas, o alimento contaminado transforma-se em alimento infectante.

A atividade de água afeta diretamente o desenvolvimento da bactéria. Embora o limite mínimo seja de 0,94, as salmonelas podem sobreviver por até mais de um ano em alimentos com baixa atividade de água.

O pH mínimo para desenvolvimento é de 3,8, abaixo ou acima deste valor há diminuição da atividade de multiplicação do agente (GERMANO; GERMANO, 2008).

O período de incubação é de 8 a 22 horas (SILVA JR, 1995).

A contaminação de salmonelas por via digestiva pode ocorrer antes, durante e depois do preparo de alimentos; após a ingestão destes, as salmonelas chegam por via linfática aos órgãos, onde se multiplicam.

Dos alimentos, o ovo, o leite e a carne são os mais sujeitos à contaminação (EVANGELISTA, 2005).

A manifestação clínica aguda é traduzida por cólicas abdominais, náuseas, vômitos, diarreia, calafrios, febre e cefaléia. O quadro clínico pode persistir por 1 a 2 dias, e a recuperação ocorre, na maior parte dos casos, após 3 dias do início da infecção.

O controle e prevenção é feito com tratamento dos efluentes e dejetos de origem animal, higiene do abate, pasteurização do leite, manipulação adequada de alimentos, conservação e cocção em temperaturas corretas, tratamento dos animais

enfermos, e prescrição cuidadosa de antibióticos nos casos humanos (e animais) a fim de diminuir a ocorrência de cepas resistentes (GERMANO; GERMANO,2008).

3.5.2.2. *Staphylococcus coagulase positiva*

O *Staphylococcus* é um coco Gram-positivo que, ao exame microscópico, pode aparecer aos pares, em cadeias curtas ou agrupado em cachos, semelhantes aos de uva (GERMANO; GERMANO,2008).

Vinculado à família dos *Micrococaceae*, o gênero *Staphylococcus* tem os *Staphylococcus aureus* e *albus* suas mais importantes espécies.

Segundo características de suas espécies, os estafilococos podem exercer, no ser humano, atividades patogênicas ou não.

Dentro de suas atividades patogênicas os *Staphylococcus* têm ação piogênicas ou tóxica como no caso de intoxicação alimentar (EVANGELISTA, 2005).

Produz enterotoxina termo-estável no alimento (SILVA JR, 1995), entre 10 e 48°C, contudo a faixa de 40 a 45°C é considerada ótima para a sua produção. O pH situa-se entre 4 e 10 (GERMANO; GERMANO,2008). Pode multiplicar-se em atividade de água baixa (0,83), tendo características de halofilia e osmofilia (reprodução em concentrações aumentadas de sal ou açúcar). Multiplica-se entre 7°C e 48°C (SILVA JR, 1995).

Um fato importante é a tolerância do *S. aureus* ao sal e à atividade de água reduzida, multiplicando-se com facilidade nos meios que contem entre 5 e 75% de cloreto de sódio.

O período de incubação médio é de 2 a 4 horas (30 minutos a 8 horas).

A contaminação de alimentos por estafilococos se verifica através do contato com indivíduos ou de animais portadores destes germes.

O nariz, as mãos, o rosto e os focos infectados localizados no corpo são fontes ativas de estafilococos, transferidas aos alimentos, principalmente quando se trata de manipuladores de produtos alimentícios.

Nos locais de preparo e consumo de refeições, a partir do ar e da poeira, os estafilococos podem se depositar em objetos e indumentários de serviçais, atingindo através destes os alimentos.

Vários alimentos, quando não sujeitos a processos de conservação ou submetidos a tratamentos térmicos insuficientes, se tornam veículos de estafilococos.

O leite não pasteurizado, queijos e natas (mastite de vacas), carnes moídas inadequadamente mantidas durante longo tempo sem tratamento de frio, são exemplos de alimentos onde facilmente crescem estafilococos produtores de enterotoxinas.

A enterotoxina estafilocócica não é destruída na pasteurização do leite (EVANGELISTA, 2005).

Os sintomas mais freqüentes são náuseas, vômitos, ânsia de vômitos, cólicas abdominais e diarreia. Em geral não há febre. Nos casos mais graves, pode-se observar cefaléia e prostração. A recuperação da maior parte dos casos ocorre em 24 a 48 horas. Inspira maiores cuidados em lactentes, idosos e enfermos (GERMANO; GERMANO, 2008). Os casos fatais causados pelo *Staphylococcus aureus* são bastante raros. Os óbitos incidem mais facilmente sobre enfermos portadores de enfermidades cardiovasculares, em pacientes em tratamento médico deficiente e em indivíduos com idades extremas (crianças e velhos) (EVANGELISTA, 2005).

Esta bactéria também é a causa comum de infecções hospitalares. Algumas de suas variedades produzem uma toxina que causa a síndrome do choque tóxico, já outras causam o envenenamento alimentar. Algumas destas bactérias são resistentes a múltiplas drogas (BURTON; ENGELKIRK, 2000).

O treinamento de manipuladores é um dos procedimentos de maior relevância para a prevenção da contaminação de alimentos durante as diferentes fases de preparo. Em relação a conservação dos alimentos, é extremamente importante a faixa de temperatura, compreendida entre 7 e 60°C, que deve ser evitada, a fim de impedir a multiplicação e a consequente produção de enterotoxina (GERMANO; GERMANO, 2008).

4 . METODOLOGIA

4.1. Tipo de pesquisa

Caracterizada como uma pesquisa descritiva laboratorial, visto que se tem a verificação da qualidade microbiológica do queijo de manteiga.

4.2. Material

O material utilizado constou de queijo de manteiga comercializado em supermercados e padarias, além de meios de cultura, vidrarias e equipamentos disponíveis no laboratório de Microbiologia de Alimentos da FARN.

4.2.1. Amostragem

Foram analisadas 20 amostras de queijo de manteiga, sendo 10 comercializadas em supermercados e 10 em padarias localizados em uma área administrativa da cidade de Natal-RN. As amostras foram adquiridas na qualidade de consumidor.

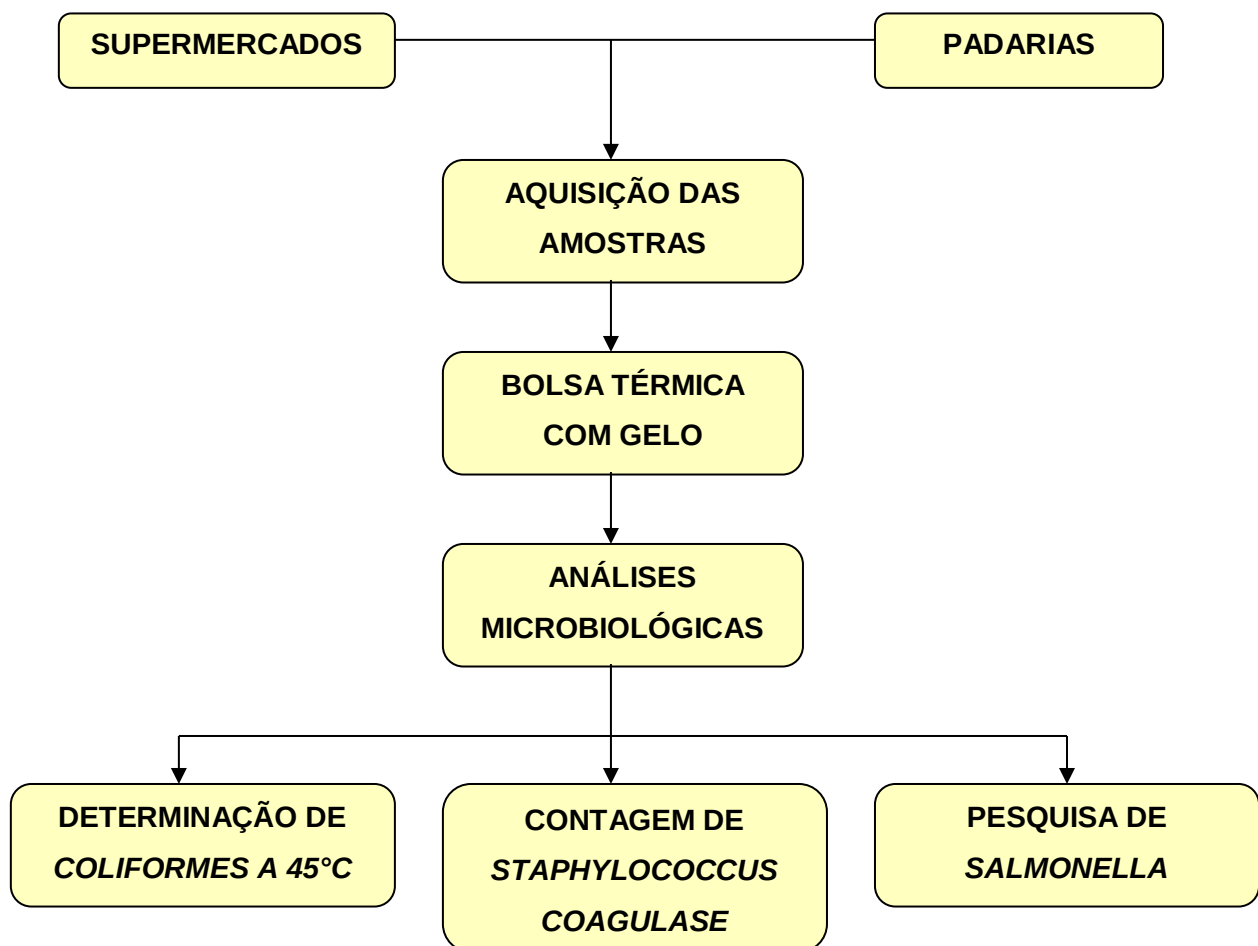


Figura 1: Fluxograma da coleta das amostras para as análises microbiológicas do queijo de manteiga. Fonte: próprio autor, 2009.

4.3. Métodos

4.3.1. Preparação da Amostra

As amostras foram preparadas de acordo com as normas do International Commission on Microbiological Specification (ICMSF, 1978). Cada amostra, que pesava aproximadamente 100 gramas, foi triturada assepticamente. Após homogeneização, foram pesadas duas porções de 25g cada. Destas, uma foi utilizada para a pesquisa de *Salmonella* e a outra, para as demais contagens. Esta última porção foi colocada em um Erlenmeyer estéril com 225mL de água fosfatada tamponada a 0,1% e homogeneizada por 2 minutos, obtendo-se a diluição inicial 10^{-1} . Partindo-se desta diluição, foram feitas mais duas diluições decimais (10^{-2} e 10^{-3}) utilizando o mesmo diluente.

4.3.2. Análises Realizadas

4.3.2.1. Determinação de coliformes à 45°C (ICMSF, 1978)

➤ **Prova presuntiva**

De cada diluição decimal da amostra, foram tomadas três porções de 1,0 mL e transferidas para tubos contendo 10 mL de Caldo Lauril com tubos de Durham invertidos. Após completa homogeneização, colocou-se os tubos na estufa à 35°C por 24 a 48 horas. Passado esse tempo, realizou-se a leitura. Os tubos que apresentaram turvação com produção de gás (positivos) foram submetidos à prova confirmatória.

➤ **Prova confirmatória**

A partir dos tubos positivos da prova presuntiva, foi semeada uma alíquota de cada cultura, com uma alça de platina, para tubos contendo 10 mL de Caldo E.C. com tubos de Durham invertidos e incubados em banho-maria à 45°C por 24 horas. Os tubos com turvação e produção de gás, após a incubação foram tidos como positivos. Para cada diluição era anotado o número de porções positivas e, através da tabela de Hoskins (APHA, 1975), era determinado o NMP de coliformes fecais por grama de queijo analisado.

O fluxograma das amostras de coliformes a 45°C pode ser visto na figura 2.

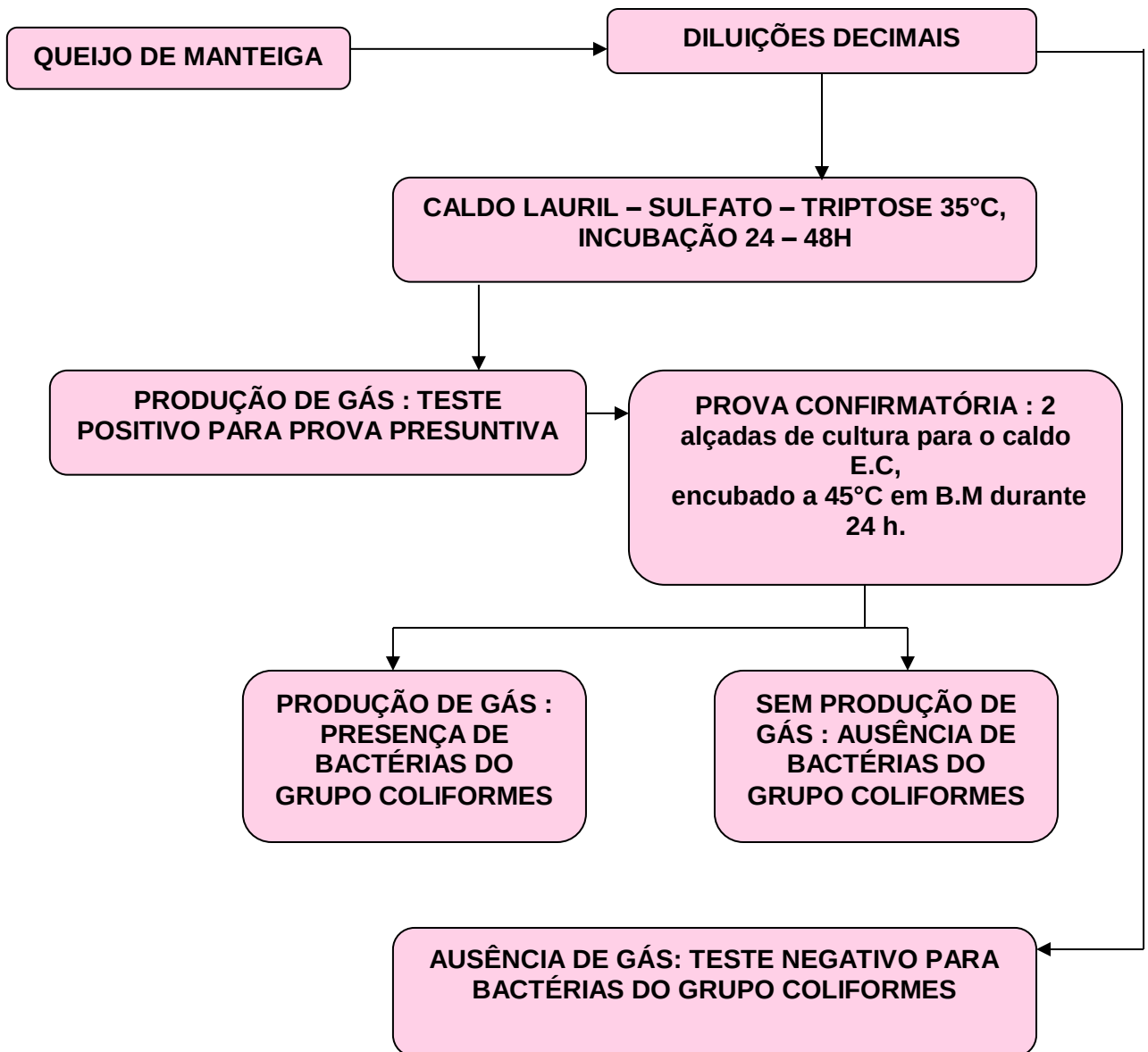


Figura 2 – Fluxograma da determinação do NMP de coliformes a 45°C em queijo de manteiga.

Fonte: próprio autor, 2009

4.3.2.2. Contagem de *Staphylococcus coagulase positiva* (ICMSF, 1978)

➤ Semeadura inicial

Inicialmente, foi semeado, em placas com Ágar Baird-Parker, 0,1 mL de cada diluição da amostra, na superfície do meio, que foram

espalhados com um Drigalsk estéril. Logo após, as placas foram levadas à estufa e incubadas a 35°C por 24 a 48 horas.

➤ **Contagem e isolamento de colônias típicas**

Após o período de incubação, foram realizadas as contagens das colônias típicas de *Staphylococcus aureus*, caracterizadas pela cor negra brilhante, com zona de precipitação branca rodeada por um halo claro transparente (BAIRD-PARKER, 1962). Após a contagem foram isoladas e semeadas no Caldo Infusão de Cérebro e Coração (BHI), e levadas para a estufa à 35°C por 24 horas.

➤ **Identificação das cepas isoladas**

Para a identificação das cepas foi realizada a Prova da coagulase (ICMSF*, 1978).

- *Prova da coagulase*

Foram realizadas semeaduras de 0,3 mL da cultura suspeita de *Staphylococcus* coagulase positiva do caldo BHI, em 0,5 mL de plasma humano. Após a incubação à 35°C por 24 horas foi feita a leitura. A prova positiva para a produção de coagulase era considerada com a parcial ou total coagulação do plasma.

* ICMSF modificado.

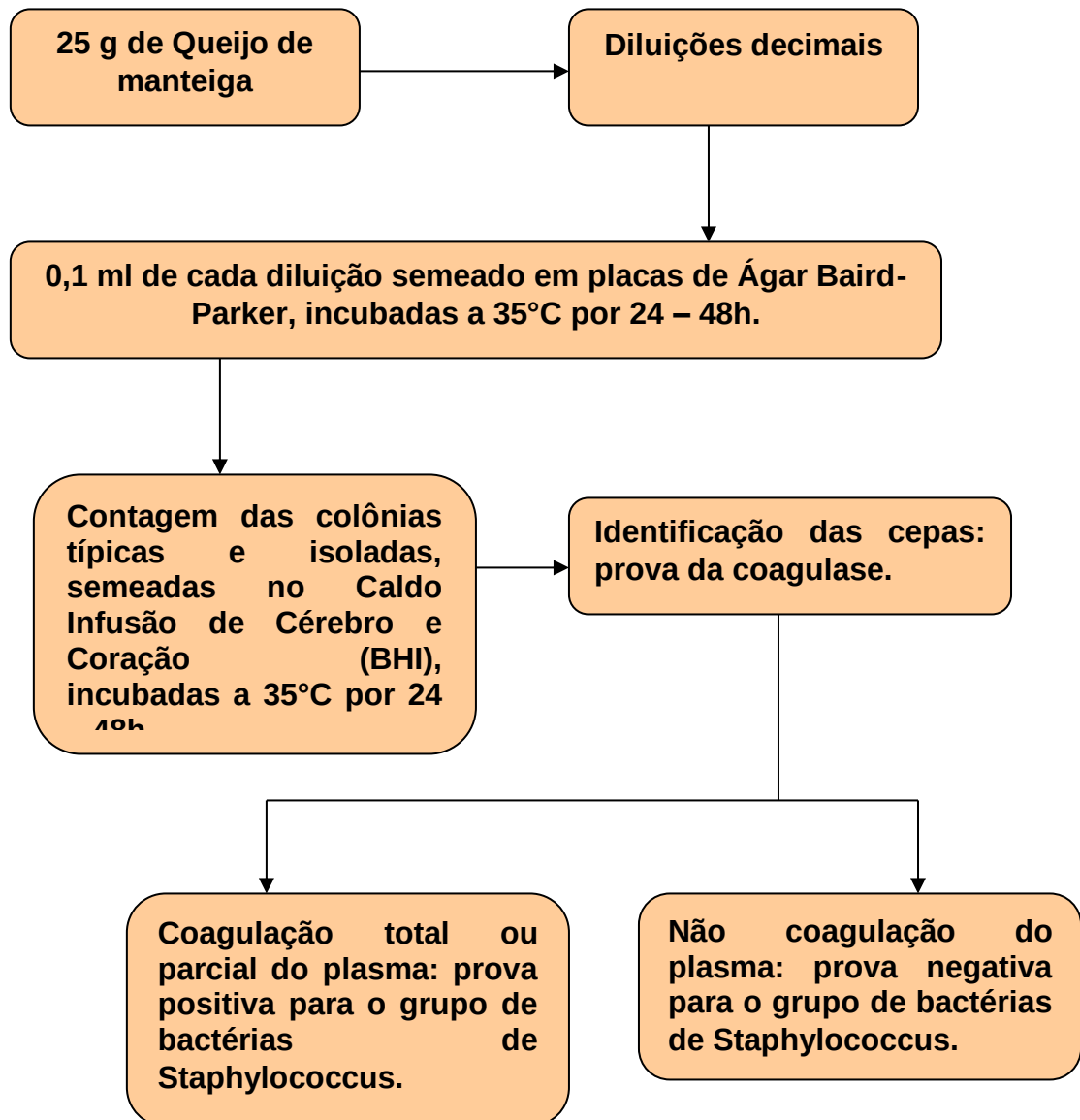


Figura 3: Fluxograma da contagem de *Staphylococcus coagulase* positiva em queijo de manteiga.

Fonte: próprio autor, 2009.

4.3.2.3. Pesquisa da *Salmonella* sp. (ICMSF, 1978)

➤ Pré-enriquecimento

Na etapa do pré-enriquecimento, o meio utilizado possibilita o reparo das injúrias sofridas pelas células, sendo, portanto, de extrema importância para o isolamento.

Foram pesados 25g da amostra e transferidos para Erlenmeyer estéril contendo 225 mL de caldo Lactosado e incubados por 24 horas à 35°C.

➤ **Enriquecimento seletivo**

Nesta etapa, 1 mL de caldo lactosado de cada amostra foi inoculado assepticamente em um tubo contendo 10 mL de caldo Selenito - Cistina e mais 1 mL em um tubo com 10 mL de caldo Tetrationato. Logo após, os tubos foram incubados a 43 °C por 24 horas.

➤ **Isolamento**

Com uma alça de níquel-cromo, foram semeados os caldos de enriquecimento seletivo, em placas de Ágar-Verde Brilhante (VB) e Ágar-Bismuto Sulfito (BS), em seguida foram incubadas a 35°C por 24 horas. As colônias suspeitas, no VB que se apresentaram com coloração rosa ou avermelhadas e no BS que se mostraram incolores, com centro negro ou não, eram submetidas aos testes bioquímicos.

➤ **Triagem**

Após o isolamento, foram transferidas três colônias típicas de cada placa de VB e BS para tubos contendo ágar inclinado Tríplice Açúcar - Ferro (TSI) e Lisina - Ferro (LIA). As cepas a serem identificadas foram inoculadas na base por picada profunda e na superfície inclinada do ágar TSI e LIA, e incubadas a 35°C por 24 horas.

A prova foi considerada positiva para *Salmonella* quando no TSI nos mostrasse o ápice alcalino (vermelho) e a base ácida (amarela), com ou sem produção de H₂S e no LIA, tanto o ápice como a base alcalina (púrpura).

➤ Provas de identificação

As cepas que se revelaram positivas no TSI e LIA, foram submetidas a alguns testes bioquímicos recomendados pelo FDA (1984), tais como: a prova de hidrólise da uréia, a degradação do malonato, o teste do vermelho de metila (VM) e Voges-Proskauer (VP) e o teste do citrato.

- *Prova de hidrólise da uréia*

De culturas de 24 horas a 35°C em ágar simples inclinado, provenientes do TSI e LIA, as cepas foram semeadas em tubos contendo 3 mL de caldo Uréia, seguido de incubação à 35°C por 24 horas. A mudança de coloração do meio indica reação positiva.

- *Prova da degradação do malonato*

Cada cepa mantida em ágar simples inclinado por 24 horas, foi inoculada em tubo contendo 2 mL de Caldo Malonato - Fenilalanina. Após incubação a 35°C por 24 horas, foi feita a interpretação das provas, verificadas pela mudança de cor. A prova positiva para a degradação do malonato foi caracterizada pela alcalinização do meio, evidenciada pelo aparecimento de coloração azul. A maioria das cepas de salmonelas são malonato negativas.

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

Essa prova foi desenvolvida conforme a metodologia descrita anteriormente. A maioria das cepas de salmonela são VM positivas e VP negativas.

- *Teste do citrato*

O teste do citrato foi realizado de acordo com o método descrito anteriormente. Sendo que a maioria das cepas de salmonelas são citrato positivas.

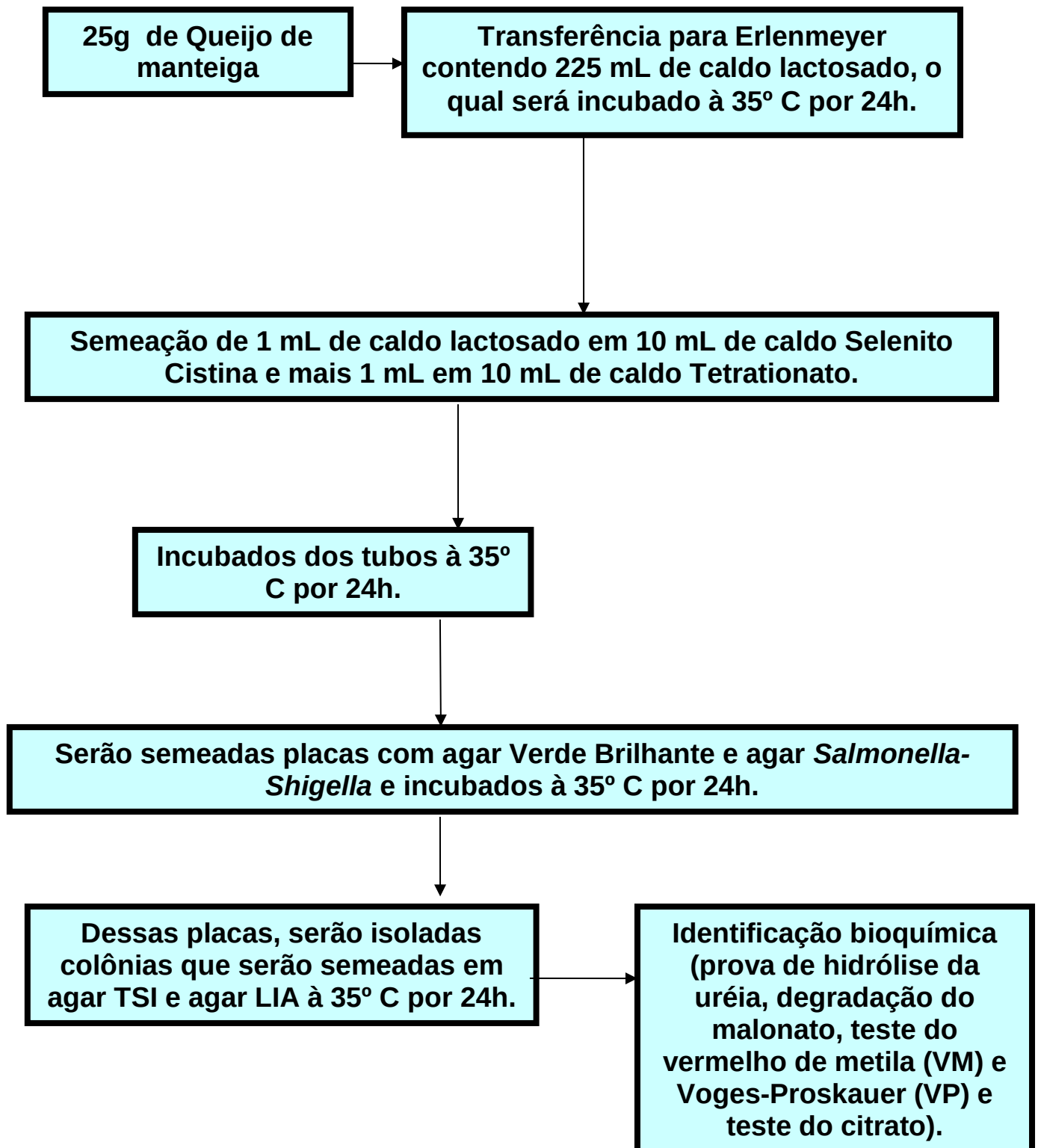


Figura 4 - Fluxograma de Contagem de *Salmonella sp.* em queijos de manteiga.

Fonte: próprio autor, 2009.

4.4. Padrão Microbiológico de Comparação

Devido à inexistência de valores de referência dos padrões microbiológicos para queijo de manteiga, os dados obtidos nas análises deste presente trabalho foram comparados, considerando a similaridade da natureza e do processamento do produto, com os padrões microbiológicos do grupo queijo, quartiolo, cremoso, criollo, mussarela (mozzarella, muzzarella) e similares: 46%, da resolução RDC nº 12, de 02 de janeiro de 2001, a qual preconiza um NMP de 5×10^3 para Coliformes a 45°C (termotolerantes), 10^3 para *Staphylococcus coagulase positiva* e ausência de *Salmonella sp.*

5. Resultados e discussão

A Tabela 1 exibe os resultados obtidos nas análises do número mais provável (NMP) de coliformes a 45°C para cada 25g de queijos de manteiga.

Tabela 1: Contagem do número mais provável de coliformes a 45°C das amostras de queijo de manteiga.

AMOSTRAS	ÍNDICE DE NMP/25g	DENTRO DO LIMITE > 2400
Amostra 1 - Supermercado	21	ABAIXO
Amostra 2 – Padaria	21	ABAIXO
Amostra 3 – Supermercado	1100	ABAIXO
Amostra 4 - Padaria	> 2400	ACIMA
Amostra 5 – Supermercado	> 2400	ACIMA
Amostra 6 – Padaria	< 3	ABAIXO
Amostra 7 – Supermercado	< 3	ABAIXO
Amostra 8 – Padaria	< 3	ABAIXO
Amostra 9 – Supermercado	< 3	ABAIXO
Amostra 10 – Padaria	75	ABAIXO
Amostra 11 – Supermercado	23	ABAIXO
Amostra 12 – Padaria	3	ABAIXO
Amostra 13 – Supermercado	< 3	ABAIXO
Amostra 14 – Padaria	< 3	ABAIXO
Amostra 15 – Supermercado	1100	ABAIXO
Amostra 16 – Padaria	3	ABAIXO
Amostra 17 – Supermercado	< 3	ABAIXO
Amostra 18 – Padaria	< 3	ABAIXO
Amostra 19 – Supermercado	< 3	ABAIXO
Amostra 20 - Padaria	< 3	ABAIXO

Fonte: Dados da pesquisa, 2009.

Já no gráfico 1 podemos observar que o número de amostras contaminadas são iguais independentes do local, supermercado ou padaria, em que estão sendo comercializadas, o que pode ser justificado com a manipulação incorreta ou pela forma de armazenamento, em temperatura de refrigeração inadequada.

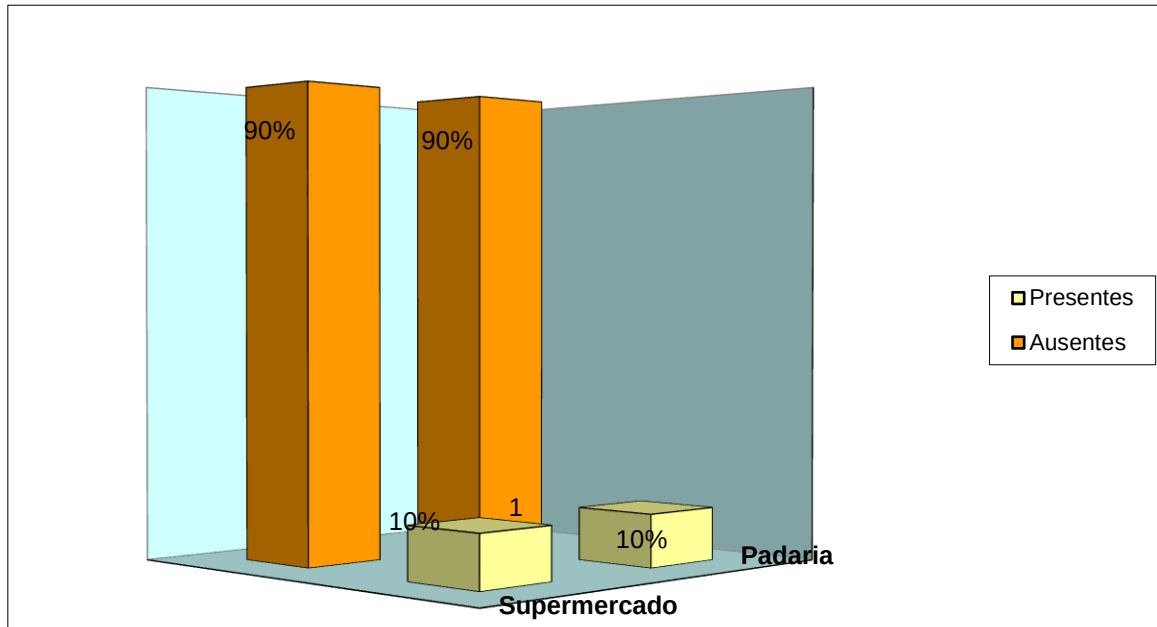


Gráfico 1 - Classificação quanto à presença de microrganismos do tipo coliformes a 45°C nas amostras de Queijo de Manteiga Comercializadas em supermercados e padarias de Natal-RN, 2009.

Fonte: Dados da pesquisa, 2009.

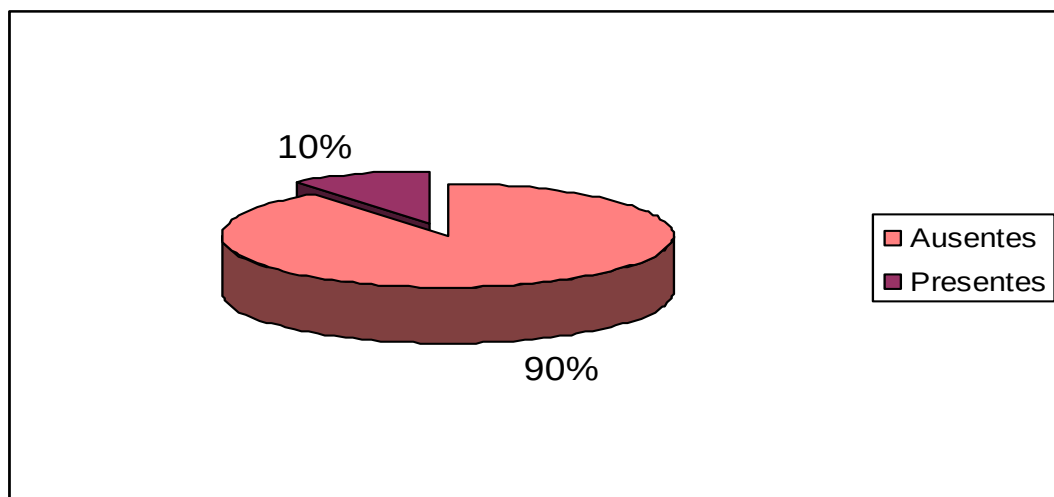


Gráfico 2 – Classificação quanto à presença de microrganismos do tipo coliformes a 45°C nas amostras de Queijo de Manteiga Comercializadas em Natal-RN, 2009.

Fonte: Dados da pesquisa, 2009.

O gráfico 2 expressa que apenas 10% das amostras analisadas apresentou um índice de NMP de coliformes a 45°C acima dos padrões permitidos pela legislação, sendo assim, 90% das amostras encontram-se dentro dos padrões da legislação.

Porém segundo Garcia et al. (2009) em pesquisa realizada no município de Currais Novos – RN, os queijos de manteiga analisados, não apresentava segurança alimentar, pois 100% das amostras continha coliformes totais e termotolerantes. De acordo com a portaria nº 146 (BRASIL, 1996), os valores máximos de coliformes totais e termotolerantes, para queijos de média umidade, são, respectivamente, $1,0 \times 10^3$ e $5,0 \times 10^2$ UFC/ml. Podem-se comparar os valores obtidos, que variam de 3,6 a > 1100 NMP/g, tanto para coliformes totais como para termotolerantes, com desta legislação para constatar a elevada contaminação das amostras.

De acordo com outro estudo realizado por Feitosa et al. (2003), em relação ao queijo de manteiga, 84,6% das amostras também apresentaram coliformes totais, sendo 15,4% coliformes fecais, apesar de que o número de coliformes fecais presentes encontravam dentro do limite estabelecido pela legislação.

Em pesquisa realizada, com amostras de queijo Minas frescal, por Santos et al. (2009), 62,5% das amostras apresentaram valor $< 5 \times 10^2$ NMP/g de crescimento para coliformes a 45°C, estando 37,5% das amostras fora dos padrões vigentes pelo regulamento técnico sobre padrões microbiológicos para alimentos, que estabelece o máximo de $5,0 \times 10^2$ NMP/g. Estudo semelhante realizado por Santana et al. (2008), constatou que 93,3% das amostras analisadas não atenderam a legislação brasileira para queijo coalho.

Ao contrário de Pietrowski et al. (2008) no que se refere aos coliformes a 45°C em queijos do tipo mussarela, as análises revelaram que 100% das amostras encontram-se dentro do padrão, que para este microrganismo é de 5×10^3 UFC/g.

Já em relação à investigação microbiológica no presente trabalho, não foi constatado a presença de *Salmonella* sp. nas amostras de queijo de manteiga analisadas, estando de acordo com a resolução, como pode ser observado no gráfico 3.

Sendo este resultado compatível a pesquisa realizada com queijo mussarela por Buzi et al. (2009), onde todas as amostras analisadas foram negativas, estando em conformidade com a Resolução RDC nº12 02/01/01, a qual determina a ausência de *Salmonella* sp. em 25g do produto analisado.

Ao contrário do resultado encontrado neste trabalho, Feitosa et al.(2003) em sua pesquisa realizada no estado do Rio Grande do Norte, encontrou como resultado que 15% (n=11) das amostras apresentavam *Salmonella sp.*

Segundo Santana et al. (2008) das amostras de queijo coalho que foram analisadas 26,7% (n=16) foram positivas ao teste de *Salmonella sp.* Já 6,25% das amostras de queijo minas analisadas por Santos et al. (2009) encontravam fora dos padrões exigidos pela legislação. Da mesma forma Pietrowski et al. (2008) em sua pesquisa constatou que em uma de suas amostras (6,25%) também estava fora do padrão.

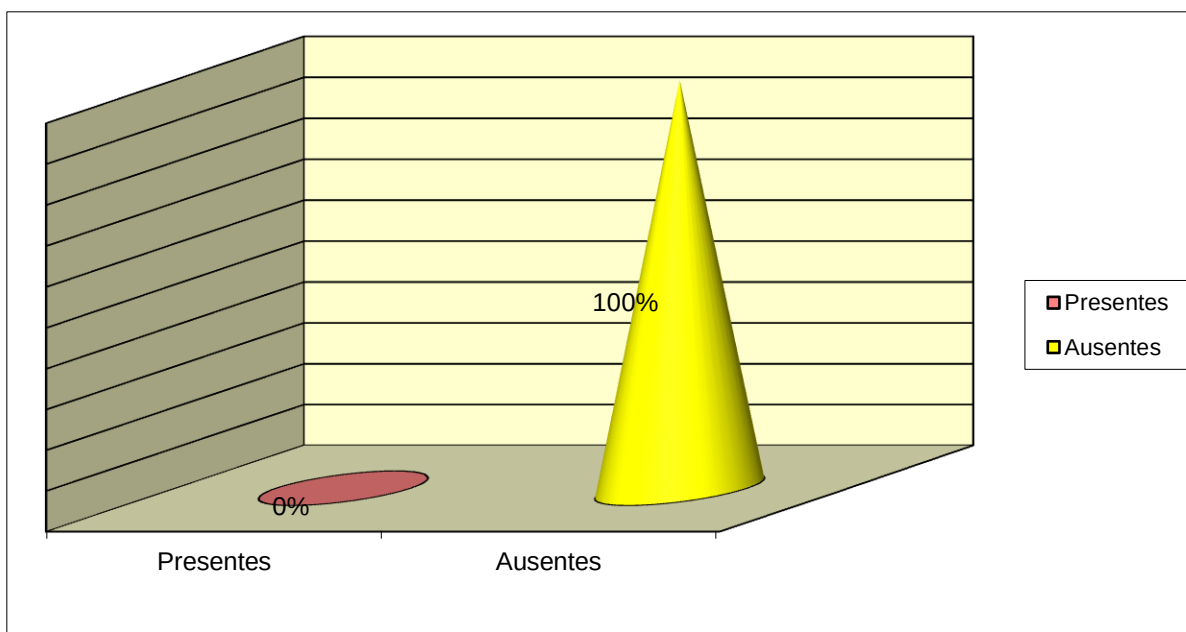


Gráfico 3 - Classificação quanto a presença de microrganismos do tipo *Salmonella sp.* nas amostras de Queijo de Manteiga Comercializadas em Natal-RN, 2009.

Fonte: Dados da pesquisa, 2009.

No que se refere à contagem de *Staphylococcus coagulase* positiva, das amostras analisadas apenas 3 amostras apresentaram resultado positivo na prova da coagulase, sendo assim, 15% das amostras estão impróprias para o consumo, como pode ser observado no gráfico 4.

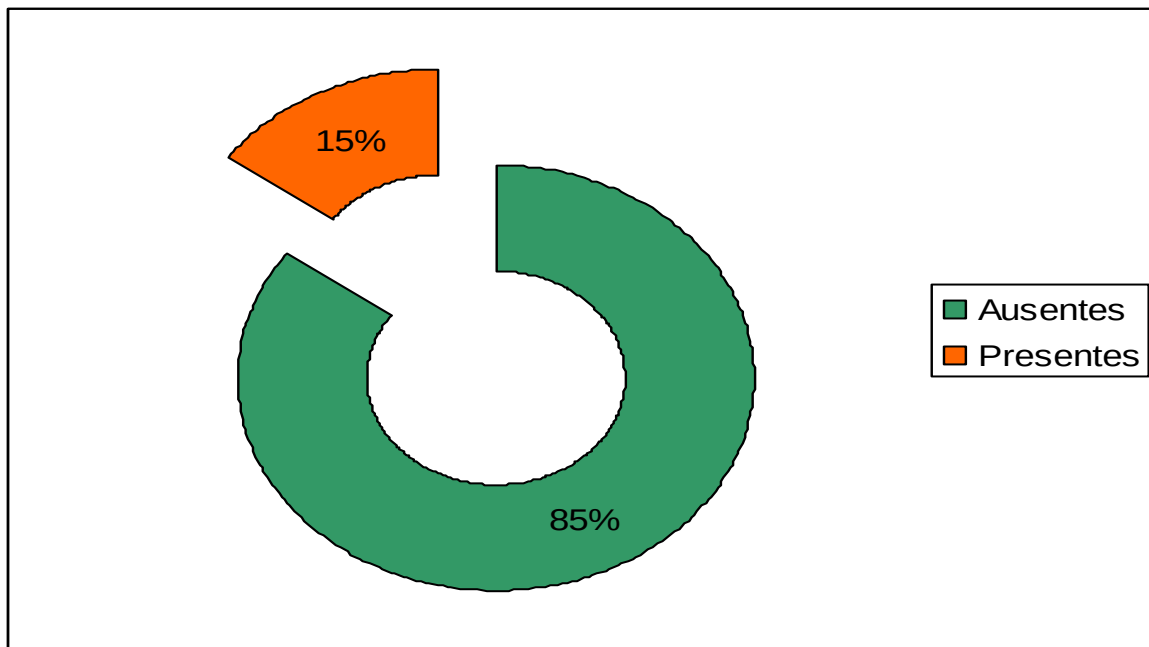


Gráfico 4 - Classificação quanto à presença de microrganismos do tipo *Staphylococcus* nas amostras de Queijo de Manteiga Comercializadas em Natal-RN, 2009.

Fonte: Dados da pesquisa, 2009.

Numa pesquisa realizada no estado do Rio Grande do Norte por Feitosa et al. (2003) a ocorrência de *Staphylococcus* foi observada em 84,7% (n=11) das 13 amostras de queijo de manteiga analisadas, sendo esse valor considerado alto e acima do limite permitido pela legislação. Resultado esse parecido com o do estudo de Santos et al. (2009), onde das 16 amostras de queijo minas 87,5% das amostras apresentaram valores acima do permitido pela legislação, que é de no máximo 5×10^2 UFC/g.

Já na pesquisa realizada por Pietrowski et al. (2008) das 16 amostras de queijo tipo mussarela analisadas, 3 amostras (18,75%) encontraram-se acima do padrão estabelecido pela RDC 12/2001, que para este microrganismo é de 10^3 UFC/g.

Em estudo realizado no município de Aracajú – SE, segundo Santana et al. (2008), 46,7% das amostras de queijo coalho analisadas estavam acima do padrão estabelecido pela legislação.

A partir destes resultados é importante lembrar que um alimento seguro, é aquele produzido sob condições higiênico sanitárias favoráveis, armazenado sobre temperaturas que mantenham as características do alimento intactas, isso traz muitos benefícios a nossa saúde, como o melhor aproveitamento dos nutrientes

contidos no alimento, e assim conseguimos evitar a contaminação alimentar, as chamadas doenças transmitidas por alimentos (DTAs).

6. Conclusão

- De acordo com as análises das amostras de queijo de manteiga, para a contagem de NMP/ 25g de *Coliformes a 45°C* 10% (n=2) das amostras encontraram-se acima do limite de acordo com a resolução RDC nº 12, de 02 de janeiro de 2001, a qual preconiza um NMP de 5×10^3 para *Coliformes a 45°C* (termotolerantes). A presença de coliformes é um indicativo da manipulação incorreta e da falta de procedimentos de Boas Práticas de Fabricação, podendo ser considerado um indicativo de contaminação de origem fecal;
- A partir da realização da pesquisa de *Salmonella sp.* nos queijos de manteiga, 100% das amostras tiveram como resultado da análise a ausência de *Salmonella sp.* Acredita-se que a sua inibição de crescimento seja porque essa bactéria não é uma boa competidora, sofrendo injúria com a presença de coliformes, principalmente, se a contaminação inicial for um número pequeno de células;
- Em relação à contagem de *Staphylococcus coagulase* positiva, das 20 amostras analisadas, apenas 15% das amostras (n=3) estavam fora do padrão da legislação. A presença deste tipo de microrganismo está diretamente relacionada à manipulação incorreta e excessiva do alimento;
- Portanto conclui-se que o queijo de manteiga analisado é considerado impróprio para o consumo humano, por apresentar 10% das amostras com índice de contaminação por *Coliformes a 45°C*, 15% das amostras com contaminação de *Staphylococcus coagulase* positiva, acima do limite permitido pela legislação;
- Desta forma sugere-se maiores cuidados na manipulação, com a utilização das Boas Práticas de Fabricação, do queijo de manteiga desde o início do processamento pelos fabricantes até a conservação e distribuição final do queijo de manteiga pelos comerciantes.

REFERÊNCIAS

ALBUQUERQUE, Ísis Penélope Sumarelli; RODRIGUES, Maria Aparecida Martins. Qualidade microbiológica do queijo tipo mussarela artesanal comercializado em Uberlândia, MG. **Revista Higiene Alimentar**. São Paulo, v. 22, n. 162, p. 101-105, julho, 2008.

Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater - APHA. Tabela de Hoskins, APHA, 1975. 20ed. Washington DC. Clesceri, L.S.; Greenberg, A.E.; Eaton, A.D.; Franson, M.A.H. (Ed), 1998. p. 9.47 – 9.55.

ARAUJO, Rinaldo dos Santos; NASSU, Renata Tieko. Caracterização físico-química de queijo de manteiga, queijo de coalho e manteiga da terra, produzidos nos estados do Rio Grande do Norte e Ceará. **Revista Higiene Alimentar**. São Paulo, v. 16, n. 97, p. 70-75, junho, 2002.

BRASIL. - Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Resolução – RDC nº175, de 8 de julho de 2003**- dispõe sobre Regulamento Técnico de Avaliação de Matérias Macroscópicas e Microscópicas Prejudiciais à Saúde Humana em Alimentos Embalados. Disponível em: <<http://e-legis.anvisa.gov.br/leisref/public/showAct.php?id=7957>> Acesso em: 03 de nov. de 2008.

BRASIL. - Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Resolução RCD 12/01, de 2 de Janeiro de 2001** - Dispõe sobre Regulamento Técnico sobre padrões microbiológicos para alimentos. Disponível em: < <http://e-legis.bvs.br/leisref/public/showAct.php> > Acesso em: 09 out. 2008.

BRASIL - Ministério da Agricultura do Abastecimento e da Reforma Agrária. **Portaria 146 de 07 de março de 1996** - Dispõe sobre o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade dos Produtos Lácteos. Brasília: MAARA/DAS/DIPOA/DNT, 1996. Disponível em: <http://extranet.agricultura.gov.br/sislegis-consulta/servlet/VisualizarAnexo?id=4344> Acesso em: 05 nov. 2008.

BURTON, Gwendolyn R. W.; ENGELKIRK, Paul G. **Microbiologia para as ciências da saúde**. 5 ed. Rio de Janeiro: Guanabara, 1998.

BUZI, Kate Aparecida et al. Análise microbiológica e caracterização eletroforética do queijo mussarela elaborado a partir de leite de búfala. **Ciência e tecnologia de alimentos**. v. 29, n. 1. Campinas. Jan/Mar. 2009. Disponível em: < http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0101-20612009000100002&script=sci_arttexte&tlng=em > Acesso em: 20 nov. 2009.

CAVALCANTE, Antônio Belfort Dantas; COSTA, José Maria Correia da. Padronização da tecnologia de fabricação do queijo manteiga. **Revista Ciência agrônômica**. Ceará. v. 36, n. 2, p. 215 – 220, maio/ ago., 2005. Disponível em: < <http://www.ccarevista.ufc.br/seer/index.php/ccarevista/article/view/276/271>. > Acesso em: 21 nov. 2009.

CORREIA, Marlene; RONCADA, Maria José. Características microscópicas de queijos prato, mussarela e mineiro comercializados em feiras livres da Cidade de São Paulo. **Revista de Saúde Pública**. São Paulo, v. 31, n. 3, junho, 1997. Disponível em: < http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0034-89101997000300011&lng=pt&nrm=iso > Acesso em : 05 nov. de 2008.

EVANGELISTA, José. **Alimentos: um estudo abrangente**. São Paulo: Atheneu, 2005.

FEITOSA, Terezinha et al. Pesquisa de *Salmonella sp.*, *Listeria sp.* E microrganismos indicadores higiênico-sanitários em queijos produzidos no estado do Rio Grande do Norte. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**. Campinas, v. 23, n. 1, dezembro, 2003. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=50101-20612003000400030&lng=pt&nrm=isso> Acesso em: 20 set. 2008.

FORSYTHE, Stephen J. **Microbiologia da segurança alimentar**. Porto Alegre: Artmed, 2005.

GARCIA, Ana Luisa Bezerra et al. **Aspectos microbiológicos do queijo de manteiga comercializado no município de Currais Novos – RN**. Instituto federal de educação, ciência e tecnologia do Piauí – IFPI. Piauí, 2009. Disponível em: < <http://www.ifpi.edu.br/eventos/iencipro/arquivos/ALIMENTOS/eda0c25aab5ba795a975487ae3afceea.pdf> > Acesso em: 20 nov. 2009.

GERMANO, Pedro Manuel Leal; GERMANO, Maria Izabel Simões. **Higiene e vigilância sanitária de alimentos: qualidade das matérias-primas, doenças transmitidas por alimentos, treinamento de recursos humanos**. 3 ed. Barueri: Manole, 2008.

INTERNATIONAL COMMISSION ON MICROBIOLOGICAL SPECIFICATION FOR FOODS. **Microorganisms in Foods I. Their Significance and Methods of Enumeration**. 2 ed. Toronto: University of Toronto Press, 1978.

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

LANDGRAF, Mariza; FRANCO, Bernadette D. Gambassy de Melo. **Controle Microbiologia dos alimentos**. São Paulo: Atheneu, 2005.

LIMA, Janice Ribeiro; NASSU, Renata Tieko; BORGES, Maria de Fátima. **Avaliação Microscópica de Queijo de Manteiga e Manteiga da Terra Produzidos Nos Estados do Ceará e Rio Grande do Norte**. **Revista Higiene Alimentar**. São Paulo, v. 16, n. 99, p. 57-60, agosto. 2002.

ORDOÑEZ, Juan A. **Tecnologia de alimentos**. Porto Alegre: Artemed, 2005.V.2.

PIETROWSKI, Giovana de Arruda Moura et al. Avaliação da qualidade microbiológica de queijo tipo mussarela comercializado na cidade de Ponta Grossa, Paraná. **Revista Brasileira de Tecnologia Agroindustrial** . UTFPR. Paraná, 2008. v. 2, n. 38. Disponível em: <

<http://www.pg.utfpr.edu.br/depog/periodicos/index.php/rbta/article/viewFile/280/248> > Acesso em: 27 nov. 2009.

RIBEIRO, J. A. Evolução da tecnologia queijeira. **Revista do instituto de laticínios Cândido Tostes**, n. 80, p 27-41, 1958.

SALINAS, Ronaldo D. **Alimentos e nutrição**- Introdução à Bromatologia. 3. ed. Porto Alegre: Artemed, 2002.

SANTANA, R. F. et al. Qualidade microbiológica de queijo Coalho comercializados em Aracajú – SE. **Arquivo brasileiro de medicina veterinária e zootecnia**. Belo Horizonte. v. 60, n. 6. Dezembro, 2008. Disponível em: < http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S010209352008000600031&lng=pt&nrm=iso > Acesso em: 18 nov. 2009.

SANTOS, Marilene dos. et al. **Avaliação microbiológica de queijos fabricados por pequenos produtores rurais do município de Guarapuava e região**. Universidade Estadual do Centro-Oeste (UNICENTRO). Paraná, 2008. Disponível em: < <http://www.unicentro.br/proec/publicacoes/salao2008/artigos/Mariele%20dos%20Santos.pdf> > Acesso em: 15 nov. 2009.

SILVA, Ana Patrícia da; CARVALHO, Irineide Teixeira de; LIMA, Maria da Glória Abage de. Qualidade sanitária de queijo prato, comercializado em supermercados de pequeno e médio porte na cidade do Recife, PE. **Revista Higiene Alimentar**. São Paulo, v. 22, n. 158, p. 92-97, janeiro/fevereiro, 2008.

SILVA, N, et al. **Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos**. 3. ed. Varela: São Paulo, 2007.

SILVA JR., Eneo Alves de. **Manual de Controle Higênico-Sanitário em Serviços de Alimentação**. 6 ed. São Paulo: Livraria Varela, 1995.

SIZER, Francês Sienkiewicz; WHITNEY, Eleanor Noss. **Nutrição :Conceitos e Controvérsias**. 8 ed. Barueri: Manole, 2003

SOUZA, Luis Henrique Lenke de. A manipulação inadequada dos alimentos: fator de contaminação. **Revista Higiene Alimentar**. São Paulo, v.20, n.146, p. 32-39, novembro, 2006.

TORTORA, Gerald J.; FUNKE, Berdell R.; CASE, Christine L. **Microbiologia**. 6 ed. Porto Alegre: Artmed, 2000.