

PESQUISA DE *Listeria* sp, *Salmonella* sp E DEMAIS INDICADORES DE CONTAMINAÇÃO EM AMOSTRAS DE QUEIJO “MINAS FRESCAL” COMERCIALIZADAS NO SUL DO ESTADO DE MINAS GERAIS¹

CARVALHO, P.L.N.^{2*}; CARVALHO, P.R.³; HOFER, E.⁴; REIS, C.M.F.⁵; VEIGA, S.M.O.M.⁶

Resumo – Em quarenta e seis amostras de queijos, sendo vinte e três de queijo caseiro (QC) e vinte e três de industrializado (QI) quantificou-se aeróbios mesófilos (AM), Estafilococos coagulase positiva (SCP), NMP de coliformes totais (CT) e fecais (CF) e pesquisou-se *Escherichia coli*, *Salmonella* sp, *Pseudomonas aeruginosa* e *Listeria* sp. Para a *Listeria* sp, adotou-se a metodologia oficial do Food and Drug Administration, incluindo-se o enriquecimento a frio (45 dias /4 °C) e sistema de microaerofilia. As médias de contagem de AM (UFC/ g) em QI ($4,88 \times 10^9$) diferiram ($P < 0,05$) do QC ($1,54 \times 10^9$). Para SCP, 47,83% (QC) e 34,78% (QI) excederam os padrões vigentes. As médias (NMP/ g) de CT foram de $2,39 \times 10^5$ (QC) e $2,48 \times 10^5$ (QI); de CF foi $1,67 \times 10^5$ (QI). *Escherichia coli* foi isolada em QC: 78,26% e QI: 60,87%, *Salmonella* em QI: 8,70% e *P. aeruginosa* em 100% de QC e QI. *Listeria* sp foi isolada antes e depois do enriquecimento, sendo identificados: *L. innocua* sorovar 6a, 6b, 4ab e não tipável. Concluiu-se pelos resultados que ambos os queijos, caseiro e industrializado, foram desqualificados para consumo por apresentarem-se fora dos parâmetros legais e oferecem riscos potenciais à saúde coletiva.

Palavras-chave: Enriquecimento a frio, *Listeria*, *Salmonella*, queijo.

Introdução

As cadeias produtivas mundial de alimentos têm se tornado cada vez mais complexas, resultando na dificuldade de se obter um alimento padronizado sob adequadas condições de segurança alimentar (FORSYTHE, 2002).

Com base nas normas de segurança alimentar, alimentos considerados seguros para consumo devem incluir, de acordo com a APPCC (Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle), controle contínuo na linha de produção. A rastreabilidade, desde a produção do leite, pasteurização, teste de controle da recontaminação e acompanhamento da microbiota desejável durante os processos envolvidos desde as etapas de produção até a comercialização, deve ser prevista para que se garanta a qualidade dos alimentos conforme os padrões de segurança alimentar (SILVA et al, 2003).

Os padrões microbiológicos e sanitários para queijo tipo “Minas Frescal” são determinados pelo Regulamento Técnico sobre os Padrões Microbiológicos para Alimentos do Ministério da Saúde (RDC nº12/01) que preconiza os limites toleráveis de Coliformes 45°C e ausência de *Salmonella* sp e *Listeria monocytogenes* em queijo “Minas Frescal”.

Apesar dos inúmeros e significativos avanços na ciência e tecnologia, as doenças de origem alimentar continuam a ser problema no mundo moderno. O

¹ Apoio financeiro do PIBIC/CNPq

² Bolsista do PIBIC/CNPq. Universidade Federal de Alfenas. UNIFAL-MG. Rua Gabriel Monteiro da Silva, 700. CEP 37130-000. Alfenas-MG. E-mail: patrikapnc@gmail.com

³ Méd. Vet., Dr., Pesquisador, Secretaria Agricultura e Abastecimento.

⁴ Méd. Vet., Dr., Pesquisador Aposentado, Depto de Bacteriologia Geral, IOC/FIOCRUZ, Rio de Janeiro-RJ

⁵ Bióloga, Departamento de Bacteriologia Geral, IOC/FIOCRUZ, Rio de Janeiro-RJ

⁶ Farmacêutica, Dra, Profa. Pesquisadora, Universidade Federal de Alfenas. UNIFAL-MG.

Centro para Controle de Doenças dos EUA considera *L. monocytogenes*, *Salmonella* sp e cepas patogênicas de *E. coli* (EC O157: H7) como patógenos emergentes implicados em casos graves de enfermidades transmitidas por alimentos e sérias preocupações de saúde pública (FIGUEIREDO, 2000).

O presente estudo teve como objetivo pesquisar *Listeria* sp, *Salmonella* sp e demais indicadores de contaminação em amostras de queijo “Minas Frescal”. Para tanto, realizou-se a análise da qualidade microbiológica de amostras de queijos tipo “Minas Frescal” de fabricação artesanal e industrializada comercializados em Alfenas-MG e região, avaliando assim, o padrão higiênico-sanitário dos produtos conforme RDC nº12/01.

Material e Métodos

Foram analisadas, em duplicata, 23 amostras de queijo caseiro (QC), de preparo artesanal e 23 amostras de queijo industrializado (QI), de quatro diferentes marcas, portando selo do SIF (Serviço de Inspeção Federal). A coleta foi realizada aleatoriamente no comércio de Alfenas-MG e região. As análises processaram-se no Laboratório Saúde Coletiva e Microbiologia de Alimentos da UNIFAL-MG, abrangendo o período de setembro de 2005 a fevereiro de 2007.

A análise microbiológica foi realizada em amostragem representativa, quantificando-se aeróbios mesófilos (AM), Estafilococos coagulase positiva (SCP), coliformes totais (CT) e fecais (CF) e por meio da pesquisa de *E. coli*, *Salmonella* sp (SILVA, JUQUEIRA; SILVEIRA, 2001) e pesquisa de *P. aeruginosa* (SILVA et al, 2005), conforme preconiza a Resolução RDC nº 12 da ANVISA de 02 de janeiro de 2001, a qual estabelece os padrões microbiológicos para alimentos destinados ao consumo humano no varejo.

Para a pesquisa de *Listeria* sp adotou-se o método oficial do *Food and Drug Administration* (SILVA; JUQUEIRA; SILVEIRA, 2001), acrescentando-se etapa de enriquecimento a frio (FARBER; PETERKIN, 1991) e sistema de microaerofilia (SILVA; HOFER; TIBANA, 1998). A confirmação antigênica dos sorogrupos e sorovares (SEELIGER; HÖHNE, 1979) de *Listeria* foi realizada no IOC/Fiocruz/RJ.

Foram realizados ensaios microbiológicos em 46 amostras de queijos para determinação de CT, CF, *E. coli*, *Listeria* sp, SCP e *Salmonella* sp e em 10 amostras para AM e *Pseudomonas* sp.

Resultados e Discussão

A contagem de AM revelou que o QI mostrou diferença ($P < 0,05$) em relação ao QC, por apresentar maior média ($4,88 \times 10^9$ UFC/g) (Tabela 1). Estes resultados permitem verificar maior contaminação nas amostras de QI, apesar das mesmas portarem carimbo do SIF. Concordando com os resultados desta pesquisa, valores de AM com contagem de $1,87 \times 10^8$ UFC/g foram reportados por Aygun, Aslantas e Oner (2005) ao realizarem estudos sobre a qualidade microbiológica de 50 amostras de queijo Carra, queijo tradicional na Turquia.

Na análise de SCP, 47,83% (QC) e 34,78% (QI) das amostragens de queijos apresentou-se em desacordo com a RDC nº 12/01. Loguercio e Aleixo (2001) obtiveram contagem de *S. aureus* acima de 10^3 UFC/g em 29 das 30 amostras analisadas de queijo tipo Minas Frescal produzido artesanalmente em Cuiabá-MT. Da mesma forma, Little et al (2008) realizaram análise da qualidade de queijos produzidos com leite cru e pasteurizado no Reino Unido. De acordo com os autores,

ambos os tipos de queijos apresentaram resultados microbiológicos insatisfatórios. No caso dos queijos provenientes de leite pasteurizado, as contagens para *S. aureus* foram de 10^3 UFC/g e para os queijos provenientes de leite cru, 10^4 UFC/g.

Tabela 1 – Quantificação de aeróbios mesófilos nos queijos tipo Minas Frescal caseiro (QC) e industrializado (QI) e estudo estatístico pelo teste t de médias

| | QC | QI |
|-----------------|----------------------|----------------------|
| Valor mínimo | $5,05 \times 10^7$ | $2,72 \times 10^9$ |
| Valor máximo | $4,44 \times 10^9$ | $8,00 \times 10^9$ |
| Média* | $1,54 \times 10^9$ A | $4,88 \times 10^9$ B |
| Teste t | 2,63 | |
| Probabilidade t | 0,0302 | |

* médias com letras distintas (A; B) nas linhas diferem significativamente ($P < 0,05$) em nível de 5% pelo teste t.

Ainda que não estabelecido pela legislação brasileira, na determinação do NMP de CT 30/35°C, foram obtidos valores altos para os queijos: QC: $> 1,1 \times 10^5$ NMP/g e QI: $> 1,1 \times 10^6$ NMP/g. Os valores determinados de mínimo, máximo e média do NMP de CT/g para o QC e QI são apresentados na tabela 2.

Os resultados apresentados na tabela 2 revelaram qualidade microbiológica semelhante ($P > 0,05$) entre a amostragem de QC ($2,39 \times 10^5$ NMP/g) e QI ($2,48 \times 10^5$ NMP/g), ainda que o QI tenha sido obtido, teoricamente, de leite pasteurizado.

Na análise de CF, os valores da tabela 2 mostraram semelhança estatística ($P > 0,05$) entre as médias da amostragem de QC ($8,19 \times 10^4$ NMP/g) e QI ($1,67 \times 10^5$ NMP/g), evidenciando possíveis falhas na pasteurização do leite usado na fabricação do QI ou ainda, recontaminação do produto final. De acordo com a RDC nº 12/01, em amostragem representativa ($n > 5$; $c > 2$; $m > 1,0 \times 10^3$; $M > 5,0 \times 10^3$), até duas amostras podem conter entre $1,0 \times 10^3$ e $5,0 \times 10^3$ NMP de CF/g (Tabela 2). Na presente pesquisa, 16 amostras de QI e 18 amostras de QC apresentaram contagens entre $1,1 \times 10^4$ e $1,1 \times 10^6$ NMP/g, evidenciando-se em desacordo.

Concordando com os resultados apresentados nesta pesquisa em relação à contaminação por coliformes fecais, Pereira et al. (1999a) também constataram qualidade semelhante em amostras de queijos “Minas Frescal” com registro ou sem registro no SIF. García Dangla et al (1985) e Kivanç (1989) também verificaram qualidade microbiológica insatisfatória em relação à contaminação por CF em QC produzidos na Costa Rica e em queijos típicos da Turquia, respectivamente.

A presença de *E. coli* ficou constatada em 78,26% da amostragem de QC e em 60,87% de QI. Resultados semelhantes foram obtidos por Feitosa et al (2003) que também relataram a presença de *E. coli* em queijos produzidos no Estado do Rio Grande do Norte. No Reino Unido, Little et al (2008) obtiveram presença de *E. coli* em queijos feitos com leite cru (10^3 UFC/g) e em queijos provenientes de leite pasteurizado (10^5 UFC/g). Na Turquia, o queijo Carra, de acordo com Aygun, Aslantas e Oner (2005), também revelou presença de *E. coli* na ordem de 10^3 UFC/g.

Analisando a amostragem de QI, verificou-se positividade de 8,70% (2/23 amostras) para *Salmonella sp.* Resultados semelhantes foram apresentados por Feitosa et al (2003) quando analisaram 11 amostras de queijo tipo coalho com 9% de positividade e 13 amostras de queijo tipo manteiga com 15% de positividade para *Salmonella sp* nestes produtos comercializados no Rio Grande do Norte, classificando-os como impróprios para o consumo e de Colak et al (2007) que, após analisarem 250 amostras de queijo Tulum feitos a partir de leite cru, detectaram a

referida bactéria em 6 amostras (2,4%). Entretanto, resultados com ausência desta bactéria em amostragem de queijos foram apresentados por Little et al (2008) e Aygun, Aslantas e Oner (2005) no Reino Unido e na Costa Rica, respectivamente.

Tabela 2 – Número Mais Provável (NMP) de coliformes total (CT) e fecal (CF) nos queijos tipo Minas Frescal caseiro (QC) e industrializado (QI) e estudo estatístico pelo teste t de médias.

| | CT (NMP/g) | | CF (NMP/g) | |
|-----------------------|----------------------|----------------------|---|----------------------|
| | QC | QI | QC | QI |
| Valor mínimo | $1,10 \times 10^5$ | $1,10 \times 10^4$ | 0 | 73 |
| Valor máximo | $1,10 \times 10^6$ | $1,10 \times 10^6$ | $1,10 \times 10^6$ | $1,10 \times 10^6$ |
| Média* | $2,39 \times 10^5$ A | $2,48 \times 10^5$ A | $8,19 \times 10^4$ A | $1,67 \times 10^5$ A |
| Teste t | -0,0722 | | -0,93 | |
| Probabilidade t | 0,9428 | | 0,3585 | |
| Padrão RDC nº 12/01** | - | | $n > 5$; $c > 2$; $m > 1,0 \times 10^3$; $M > 5,0 \times 10^3$ | |

* médias com letras iguais nas linhas não diferem ($P > 0,05$) em nível de 5% pelo teste t.

**n: número de unidades a serem colhidas aleatoriamente de um mesmo lote e analisadas individualmente; c: número máximo aceitável de unidades de amostras com contagens entre os limites m e M; m: separa o lote aceitável do produto ou lote com qualidade intermediária aceitável; M: separa o lote aceitável do inaceitável. Valores acima de M são inaceitáveis.

A presença de *P. aeruginosa* ocorreu em 100% das amostras analisadas de QC e QI. Com relação ao percentual alto de contaminação, Carvalho (2001) considerou que *Pseudomonas sp* é um possível indicador de contaminação, podendo evidenciar o uso de água não potável ou manipulação inadequada na produção do alimento.

Considerando a positividade para o microrganismo *Listeria sp*, é importante ressaltar que esta foi de 4,35% (QC) e 21,74% (QI) antes e de 34,70% (QI) depois do enriquecimento a frio (45 dias em geladeira/4°C).

Isolou-se a espécie *L. innocua* em ambas as amostragens de QC e QI. Estes resultados são concordantes com afirmativa de Pereira e Roccourt (1994), Farber e Peterkin (1991) e Pereira et al. (1999b) ao descrevem que a temperatura de refrigeração favorece o crescimento de *Listeria sp*, provavelmente por inibir a microbiota concorrente.

De acordo com Laciari, Vaca e Centorni (1999) a característica psicotrófica da *Listeria sp* constitui-se problema na conservação de alimentos por longos períodos de tempo sob baixas temperaturas, pois favoreceria seu crescimento, implicando também em perdas econômicas para a indústria alimentícia.

Nesta pesquisa, as cepas isoladas de *Listeria sp* com respectivos sorovares tipificados na FIOCRUZ-RJ foram: QC: *L. innocua* sorovar 6a; QI (marca R): *L. innocua* sorovar 6a (66,67%), 6b (16,67%), 4ab (16,67%) e não tipável (16,67%) antes e 4ab (100%) e não tipável (16,67%) depois do enriquecimento a frio (geladeira 4°C/45dias).

Conforme estudos e análises realizadas por Hofer (2001) em 3112 amostras no período de 1971 a 1997, a identificação de *L. innocua* prevaleceu sobre as demais espécies, sendo 80,9% (1889 amostras) de positividade para esta espécie dentre os isolamentos. Em regiões da Colômbia, Aygun e Pehlivanlar (2006) analisaram dentre outros produtos, o queijo branco turco. O resultado revelou isolamento de *L. monocytogenes* em 8,23% do queijo branco turco. Beckers, Soentoro e Delgou-Van-Asch (1987) detectaram a presença de 10,14% (sete em 69 amostras) de *L. monocytogenes* em amostras de queijo preparados com leite cru.

Resultados semelhantes ao da presente pesquisa foram reportados por Santos et al. (2001) e Guerra e Bernardo (2001) ao mencionarem que a formação de biofilme na superfície de materiais fabris e tubulações fechadas por ser de difícil remoção, tendem a tornar o ambiente propício ao desenvolvimento de microrganismos potencialmente patogênicos, incluindo os do gênero *Listeria*. Assim, de acordo com as circunstâncias relatadas, pode-se explicar em parte, a incidência de *Listeria* sp em QI. Em pesquisa realizada por Silva, Hofer e Tibana (1998) ocorreu isolamento de 17,65% de *L. innocua* e 41,17% de *L. monocytogenes* em 103 amostras de queijos, sendo que destas, 17 amostras eram QC.

De acordo Kamat e Nair (1996), *L. innocua* pode ser um organismo ideal e seguro como um marcador de *L. monocytogenes* em indústrias alimentícias.

Conclusões

O microrganismo *L. innocua* foi isolado das amostras de QC e QI, antes e depois da etapa de enriquecimento a frio, identificando-se os sorovares *L. innocua* 6a, 6b, 4ab e não tipável. Ambos os tipos de queijos mostraram-se em desacordo com a legislação vigente.

O QI, mesmo portando selo do SIF, não apresentou melhor qualidade sob ponto de vista microbiológico em relação ao QC.

A presença de coliformes fecais, acima dos limites estabelecidos pela legislação, reafirma potenciais riscos quanto à presença de patógenos intestinais.

A semelhança estatística entre a qualidade microbiológica das amostragens de QC e QI, em relação aos microrganismos indicadores de contaminação, mostra que ambos os produtos não atendem as normas de segurança alimentar.

Referências Bibliográficas

1. AYGUN, O.; ASLANTAS, O.; ONER, S. A survey on the microbiological quality of Carra, a traditional Turkish cheese. **J Food Eng**, v. 66, n. 3, p. 401-404, fev., 2005.
2. AYGUN, O.; PEHLIVANLAR, S. *Listeria* spp. in the raw milk and dairy products in Antakya, Turkey. **Food Control**, v. 17, n. 8, p. 676-679, ago. 2006.
3. BECKERS, H.J.; SOENTORO, P.S.S.; DELGOU-VAN-ASCH, E.H.M. The occurrence of *L. monocytogenes* in soft cheeses and raw milk and the resistance to heat. **Int J Food Microbiol.**, v. 4, n. 3, p. 249-256, 1987.
4. BRASIL. Ministério da Agricultura. *Instrução normativa nº 51 de 18 de setembro de 2002*. Brasília, DF, 2002.
5. BRASIL. Resolução RDC ANVISA/MS nº 12, de 02 de janeiro de 2001. Regulamento Técnico sobre os Padrões Microbiológicos para Alimentos. **DOU. Brasília, DF, 10 jan. 2001. Seção I**, p. 45-53.
6. CARVALHO, E. P. **Microbiologia de alimentos**. Curso de Pós-graduação "Latu sensu" (especialização) à distância. Processamento e controle de qualidade em carne, leite, ovos e pescado. UFLA. Lavras-MG, 2001. 128p.
7. COLAK, H.; HAMPKYAN, H.; BINGOL, E.B.; ULUSOY, B. Prevalence of *L. monocytogenes* and *Salmonella* spp. in Tulum cheese. **Food Control**, v. 18, n. 5, p. 576-579, maio. 2007.
8. FARBER, J. M.; PETERKIN, P. I. *Listeria monocytogenes*, a food-borne pathogen. **Microbiological Reviews**, v. 55, n. 3, p. 476-511, 1991.
9. FIGUEIREDO, E. A. T. **Ocorrência do gênero *Listeria* e avaliação da diversidade genética de *Listeria monocytogenes* através do Random Amplified**

- polymorphic DNA (RAPD) e sua distribuição em linha de processamento de leite pasteurizado tipo "C".** 2000, 100f. Dissertação (Doutorado em Microbiologia), Instituto de Ciências Biomédicas, USP. São Paulo, 2000.
10. FORSYTHE, S. J. Microbiologia da segurança alimentar. São Paulo: ARTMED, 2002. 424 p.
11. GARCÍA DANGLA, I.; MURILLO SOLÍS, R.; BARQUERO, C.; NÚÑEZ, B. Microbiological quality of home-made cheese produced in Costa Rica. **Arch Latinoam Nutr.**, v. 35, n. 3, p. 466-479, set., 1985.
12. GUERRA, M. M.; BERNARDO, F. A. Fontes de contaminação dos alimentos por *Listeria monocytogenes*. **Rev. Hig. Alim.**, v. 18, n. 120, p. 12-18, 2001.
13. HOFER, E. Três décadas de experiência sobre *Listeria* no Brasil. In: Ciência de Alimentos – avanços e perspectivas. Ed. Mercadantes, AZ; Bobbio, FO; Bobbio, PA; Pereira, JL; Pastore, GM. FEA/UNICAMP, 2001. vol. II, cap. 33, p. 111-115.
14. KAMAT, A. S.; NAIR, P. M. Identification of *L. innocua* as a Biological indicator for inactivation of *L. monocytogenes* by some meat processing treatments. **Lebensmittel Wissenschaft Technologie**, London, v. 29, p. 714-720, 1996.
15. KIVANÇ, M. A survey on the microbiological quality of various cheeses in Turkey. **Int. J of Food Microbiol**, short communication, v. 9, n. 1, p. 73-77, ago. 1989.
16. LACIAR, A. L.; VACA, L.; CENTORBI, O. N. P. *Listeria* spp. en alimentos de origen animal. **Rev. Argent Microb**, n 31, p. 25-30, 1999.
17. LITTLE, C.L.; RHOADES, J.R.; SAGOO, S.K.; HARRIS, J.; GREENWOOD, M.; MITHANI, V.; GRANT, K.; MCLAUCHLIN, J. Microbiological quality of retail cheeses made from raw, thermized or pasteurized milk in the UK. **Food Microbiol**, v. 25, n. 2, p. 304-312, fev., 2008.
18. LOGUERCIO, A. P.; ALEIXO, J. A. G. Microbiologia de queijo tipo minas frescal produzido artesanalmente. **Ciênc. Rural**, v. 31, n. 6, p. 1063-1067, 2001.
19. PEREIRA, M. L., GASTELOIS, M. C. A., BASTOS, E. M. A. F. CAIAFFA, W. T.; FALEIRO, E. S. C. Enumeration of fecal coliforms and presense of Salmonella sp in Minas cheese. **Arq. Brasil. Med. Vet. Zootec.**, v. 51, n. 5, p. 427-431, 1999a.
20. PEREIRA, M.L.; REZENDE, P.R.; MACHADO, E.C.; FORTES-DIAS, C.L.; HOFER, E.; CATIMEL, B.; ROCOURT, J. Queijo tipo Minas. **VIII - Sobrevivência e recuperação de *Listeria monocytogenes* no produto estocado à temperatura de -20°C.** In: III Simpósio Latino-Americano de Ciência e Alimentos, 1999, Campinas - SP. Livro de Programa e Resumos. São Paulo: UNICAMP, 1999b. p. 105-105.
21. PEREIRA, M. L.; ROCOURT, J. Métodos de detecção de *Listeria monocytogenes* em alimentos: uma revisão. **Rev. Hig. Alim.**, v. 8, n. 30, p. 12-16, 1994.
22. SANTOS, L. A. G.; TEODORO, V. A. M.; MONTEIRO, L. L.; GUIMARÃES, K. R.; PINTO, P. S. A.; BEVILACQUA, P. D. Listeriose transmissível por produtos de origem animal. **Rev. Hig. Alim.**, v. 18, n. 124, p. 35-42, 2001.
23. SEELIGER, H.P.R.; HOHNE, K. Serotyping of *Listeria monocytogenes* and related species. **Meth in Microbiol**, p. 330-348, cap. 11. New York: Academic, 1979.
24. SILVA, I. M.; ALMEIDA, R. C. C.; ALVES, M. A. O.; ALMEIDA, P. F. Occurrence of *Listeria* spp. in critical control points and the environment of Minas Frescal cheese processing. **International Journal of Food Microbiology**, v. 81, n. 3, p. 241-248, 2003.
25. SILVA, M.C; HOFER, E.; TIBANA, A. Incidence of *L. monocytogenes* in cheese produced in Rio de Janeiro, Brazil. **J. Food Protect**, v. 61, n. 3, p. 354-356, 1998.
26. SILVA, N.; JUNQUEIRA, V.C.A.; SILVEIRA, N.F.A. **Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos.** 2 ed. São Paulo: Varela, 2001. 317 p.
27. SILVA, N.; NETO, R.C.; JUNQUEIRA, V.C.A.; SILVEIRA, N.F.A. **Manual de métodos de análise microbiológica da água.** São Paulo: Varela, 2005. 164 p.