

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60  
61

Avaliação da qualidade microbiológica em amostras de queijo de coalho comercializado no município de Itacoatiara - AM.

Rosiane Moraes de SOUZA<sup>I</sup>; Aluizio Gonçalves BRASIL JUNIOR<sup>II</sup>

<sup>I</sup> Instituto de Ciências Exatas e Tecnologia, Universidade Federal do Amazonas, 69103-128, Itacoatiara-AM – rose\_bb12@hotmail.com

<sup>II</sup> Instituto de Ciências Exatas e Tecnologia Universidade Federal do Amazonas, 69103-128, Itacoatiara-AM – aluiziogbj@yahoo.com.br

62  
63 Avaliação da qualidade microbiológica em amostras de queijo de coalho comercializado  
64 no município de Itacoatiara - AM.

65  
66 Resumo:

67  
O queijo de coalho é um alimento amplamente consumido entre os amazonenses, caracterizado como um produto de relevante importância socioeconômica e nutricional. Na região, a produção é realizada em grande maioria de modo artesanal por pequenos produtores, tendo como matéria prima o leite cru, o que torna esta prática um meio propício à contaminação do produto final. A ausência de boas práticas de fabricação, atrelado a procedimentos inadequados de acondicionamento, transporte e armazenamento em estabelecimentos comerciais, resulta em exposição do consumidor ao risco de adquirir doenças transmitidas por alimentos. Por sua importância relacionada a aspectos sanitários e socioeconômicos, o trabalho objetivou avaliar as condições higiênico-sanitárias do queijo de coalho comercializado no município de Itacoatiara – AM, por meio de análises microbiológicas, através da determinação do Número Mais Provável (NMP/g) de coliformes totais e fecais a 35 e 45 °C, pesquisa de *Escherichia coli* e *Salmonellas* sp., além da contagem de *Staphylococcus aureus* e mesófilos. Foram realizadas visitas aos estabelecimentos sendo observadas condutas inadequados à alimentos. Por meio da análise microbiológica, seguindo metodologias da American Public Health Association (APHA), US Food and Drug Administration (FDA) e da ISO 6579:2007, foram investigadas 6 amostras de queijo de coalho provenientes de dois fornecedores - feira municipal, das quais os resultados apontaram 33,4% de contaminação por *E. coli* das amostras analisadas, com registro dos NMP/g de coliformes acima de 2.400; presença de *Salmonella* sp. em 16,7% e a média das contagens de *Staphylococcus aureus* e mesófilos foi de  $1,3 \times 10^6$  UFC/g e  $2,8 \times 10^4$  UFC/g , respectivamente, demonstrando condições impróprias para o consumo humano como regulamenta a Agência Nacional de Vigilância Sanitária, conforme resolução nº12/2001. Visando minimizar a

contaminação microbiana se fazem necessários a capacitação contínua dos produtores, ampliação das inspeções sanitárias e o acompanhamento por meio de análises para caracterizar a qualidade microbiológica do produto lácteo comercializado.

Palavras-chave: Condições higiênico-sanitárias, Contaminação de produtos lácteos, Boas Práticas de Fabricação.

## Abstract:

The cheese curd is a food widely consumed among the Amazonians, characterized as a product of a substantial socioeconomic and nutritional. In the region, production is held in vast majority of artisanal way by small producers, whose feedstock raw milk, which makes this practice a means conducive to contamination of the final product. The lack of good manufacturing practices, linked to inadequate procedures for packaging, transport and storage in commercial establishments, resulting in consumer exposure to the risk of acquiring foodborne illness. Because of its importance related to health and socioeconomic aspects, the study aimed to assess the sanitary conditions of curd cheese sold in Itacoatiara - AM through microbiological analysis by determining the most probable number of total and fecal coliforms to 35 and 45 ° C, search of *Escherichia coli* and *Salmonella* sp. beyond count of *Staphylococcus aureus* and mesophilic. Visits were made to establishments being observed misconduct will food. Through microbiological analysis, following methods of the American Public Health Association (APHA), U.S. Food and Drug Administration (FDA) and ISO 6579:2007, 6 were investigated samples of cheese curd from the county fair, the results of which showed 33.4% of contamination by *E. coli* samples analyzed with the log MPN / g of coliforms above 2400.0; presence of *Salmonella* sp. 16.7% and the average counts of mesophilic and *S. aureus* was  $1,3 \times 10^6$  UFC/g and  $2,8 \times 10^4$  UFC/g , respectively, showing conditions unfit for human consumption, according regulates the National Agency for Sanitary Vigilance, through Board Resolution No. 12 of January 2, 2001. To minimize microbial contamination are necessary to continuous training of farmers, extension of health inspections and monitoring through analysis to characterize the microbiological quality of the milk product marketed.

Keywords: Sanitary condition, contamination of dairy products, Good Manufacturing Practices.

## 1. Introdução

O queijo coalho é um alimento de grande comercialização no estado do Amazonas, por apresentar vantagens como a fácil aceitação pelos consumidores, baixo custo e processo de fabricação simples. Segundo o Ministério da Agricultura e do Abastecimento, entende-se por queijo o produto fresco ou maturado obtido 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 bactérias específicas, de ácidos orgânicos, isolados ou combinados, todos de qualidade aceitável para o uso alimentar, com ou sem agregação de substâncias alimentícias e/ou condimentos, aditivos especificamente indicados, substâncias aromatizantes e matérias corantes (BRASIL 2008).

O queijo é obtido por coagulação do leite por meio de coalho, complementada ou não pela ação de bactérias lácteas selecionadas (*Streptococcus leuconostoc*, *Lactobacillus* sp.), é classificado como queijo de média a alta umidade, sendo denominado de queijo de coalho (Brasil 1996).

Como derivado tradicional do leite, o queijo com propriedades organolépticas e nutritivas, tem grande aceitação no mercado, apresentando-se para o consumo com diversas variedades quanto ao tipo, sabor, cor, forma e aroma, a fim de satisfazer aos vários paladares dos seus consumidores (Nogueira 2006).

A fabricação de queijos consiste uma série de operações desde a produção de leite até o último dia de maturação e expedição para o mercado. A qualidade do queijo depende diretamente da qualidade do leite, sendo necessário um rígido controle durante

todas as fases de processamento, pois a matéria prima muitas vezes não recebe o tratamento adequado, seja na ordenha, acondicionamento ou transporte, favorecendo assim a sua contaminação e interferindo nas características higiênico-sanitárias do produto final.

Durante o processo de produção, elaboração, transporte, armazenamento e distribuição, a contaminação microbiana dos alimentos é indesejável e, inclusive, nociva, assim, a exposição do produto durante a comercialização traz como consequência queijos de baixa qualidade expondo o consumidor ao risco de Doenças Transmitidas por Alimentos (DTA). O ar, o ambiente, as embalagens primárias, as mãos dos funcionários, bem como os equipamentos e os utensílios, constituem pontos importantes que devem ser ajustados às Boas Práticas de Fabricação (BPF) de forma a não representarem risco de contágio ao produto (Peixoto *et al.* 2007), e desta forma evitar os surtos decorrentes de alimentos contaminados.

O queijo de coalho, por ser elaborado em pequenas propriedades rurais ou em pequenas indústrias, que não adotam as BPF, é obtido em condições higiênico-sanitárias deficientes e precárias, não apresentando segurança microbiológica e padronização de qualidade. Essa contaminação assume destacada relevância para a saúde pública, principalmente quando o alimento é consumido sem tratamento térmico. Dessa forma, para o leite e seus derivados, cuidados higiênicos desde a ordenha até a obtenção do produto final devem ser empregados (Catao e Ceballos 2001).

A qualidade do queijo de coalho está diretamente relacionada ao fato de sua matéria prima também ser de qualidade, e por isso o Ministério da Saúde através da Resolução da Diretoria Colegiada RDC n° 12/2001 da ANVISA, estabelece os padrões Microbiológicos para alimentos bem como adota metodologia analítica editada

pela Association of Official Analytical Chemists (FDA/AOAC). A ANVISA considera ainda para o queijo de coalho através do Número Mais Provável por grama (NMP/g) uma tolerância de  $5 \times 10^2$  da amostra para Coliformes a 45 ° e *Staphylococcus* coagulase positiva e ausência de *Salmonella* sp. e *L. monocytogenes*.

Normalmente, dentre os microrganismos encontrados no queijo de coalho, em função da ausência de BPF, destacam-se coliformes totais e fecais, *Escherichia coli*, *Salmonella* sp. e *Staphylococcus aureus* (Santana *et al.* 2008). Tendo-se a importância de se identificar a presença de coliformes fecais em produtos derivados do leite, tanto pelo aspecto sanitário como o de saúde pública, porém, deve-se destacar o papel destes microrganismos no processo industrial, no que diz respeito às características e aspectos de cada tipo específico de queijo. Beux (2011) corrobora afirmando que os coliformes metabolizam a lactose, produzindo, entre outras substâncias, ácido lático e CO<sub>2</sub>, que fica retido na massa dos queijos, provocando o aparecimento de pequenos orifícios, também chamados de olhaduras, e, quando o número de coliformes é excessivo, o gás provoca o estufamento do queijo.

Por suas características de processamento inadequado, os queijos produzidos em pequenas fábricas, ou artesanalmente, apresentam em geral uma grande quantidade de microrganismos responsáveis pela deterioração e ou a redução da vida útil do produto (Peixoto *et al.* 2007). Faz-se necessário para um maior controle de qualidade, a determinação de agentes indicadores os quais irão fornecer informações da ocorrência de contaminantes de origem fecal, com a possibilidade de identificação de microrganismos patogênicos.

Neste trabalho, foram adotados como indicadores das condições higiênico-sanitárias do queijo de coalho a contagem de coliforme total; contagem de coliforme

termotolerante (45 °C); contagem de *Staphylococcus* coagulase positiva; a pesquisa de *Escherichia coli*, bem como de *Salmonella* sp.. Esses microrganismos estão relacionados à maioria dos casos de gastroenterites. Durante o desenvolvimento da pesquisa levou-se em consideração o desenvolvimento de uma proposta de trabalho para adoção de boas práticas de fabricação e manipulação voltada para produtores e comerciantes.

A oferta de produtos adequados ao consumo, sem expor a saúde do consumidor, eleva a credibilidade do produtor e conseqüentemente seu retorno econômico. Por isso torna-se necessário conhecer a qualidade higiênica sanitária aplicada em todo o processamento, uma vez que, através deste conhecimento podem-se determinar os grupos de microrganismos indicadores e patogênicos encontrados no alimento bem como sua origem.

## 2. Materiais e Métodos

### 2.1 Materiais

- Água peptonada a 0,1% (AP);
- Ágar Baird Parker (BP);
- Ágar Padrão para Contagem (PCA);
- Ágar Xilose-Lisina-Desoxicolato (XLD);
- Ágar tríplice açúcar ferro (TSI);
- Ágar Eosina-azul de Metileno (EMB);
- Ágar Nutriente inclinado;
- Caldo de Cérebro e Coração (BHI)



- Caldo Rappaport-Vassiliadis Soja (CRV);
- Caldo Verde Brilhante Bile (CVB);
- Caldo Lauril Sulfato Triptose (CL);
- Caldo *E.coli* (CEC);
- Placa de Petri;
- Alça de Drigalski;
- Tubo de Durhan;
- Tudo de Ensaio;
- Erlenmeyer;
- Alça de platina;
- Haste de platina;
- Pipeta de 10 mL;
- Pipeta de 1 mL;
- Bico de bulsen;
- Balança semi analítica;
- Autoclave;
- Estufa;
- Reagente de Kovac's;
- Teste de fermentação de lactose e sacarose
- Enterokit B para identificação bacteriana - CITRATO, MILI EPM (Probac)

## 2.2 Coleta de amostras

Foram coletadas aleatoriamente amostras de dois estabelecimentos que vendem queijo na feira municipal de Itacoatiara, selecionada por se tratar da única feira a realizar a venda de queijo de coalho e por ter alto fluxo de comercialização, sendo que em cada ponto de coleta tomou-se três amostras em momentos diferentes. As amostras foram fracionadas, identificadas, pesadas na embalagem comercial originária do local de venda, acondicionada em caixas isotérmicas e transportada, em seguida, até o laboratório de microbiologia do Instituto de Ciências Exatas e Tecnologia (ICET/UFAM), onde se realizou, imediatamente, o processamento e a análise da amostra (Silva *et al.* 2010).

## 2.3 Métodos de análise

### 2.3.1 Contagem de *Staphylococcus* coagulase positiva

Para a análise *Staphylococcus* Coagulase Positiva, foram feitas diluições -  $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$  e  $10^{-3}$ , das quais foram retiradas 0,1 mL e semeadas com alça de Drigalski em superfície de Ágar Baird-Parker suplementado com emulsão de gema de ovo e solução de Telurito de Potássio. Depois de incubadas as placas a 35 °C por 48h foram contadas as colônias características de cor negra típicas de *Staphylococcus aureus* (Pietrowski 2008; Silva *et al.* 2010).

### 2.3.2 Contagem de Coliformes Totais e Termotolerantes (45 °C)

O método clássico de contagem de coliformes totais, termotolerantes e *E. coli* em água e alimentos é o do Número Mais Provável (NMP), que inclui as seguintes etapas: 1) teste presuntivo, em que alíquotas de três diluições da amostra foram inoculadas em uma série de três tubos contendo Caldo Lauril Sulfato Triptose (LST). O LST contém lactose que fermenta e permite turvação com produção de gás nos tubos de

Durhan a partir da qual se pode observar crescimento. O teste presuntivo foi realizado em tubos contendo caldo Lauril Sulfato Triptose, incubados em estufa a 35-37 °C, por 24-48h. O caldo presente nos tubos positivos foi semeado em caldo verde brilhante bile 2% (VBBL) e incubado a 35 °C, durante 24-48h, para confirmação de coliformes totais, e semeados em tubos contendo caldo *E. coli* (EC), incubados a 45,5 °C, por 24-48 horas, para confirmação de coliformes termotolerantes (Pietrowski 2008; Silva *et al.* 2010; Dantas 2012).

### 2.3.3 Pesquisa de *Salmonella* sp.

Para a detecção de *Salmonella* spp., a diluição  $10^{-1}$  em caldo Lauril Sulfato Triptose foi incubada a 35 °C por 18-20h (pré-enriquecimento). Posteriormente, transferiu-se volumes de 1 ml para tubo contendo 10 ml de caldo Rapaport-Vassiliadis Soja que foram incubados a 42 °C (enriquecimento seletivo). Após 24h, realizaram-se repiques em placas de ágar Eosina-azul de Metileno (EMB) e ágar Xilose Lisina Desoxicolato (XLD), que foram incubadas a 35 °C por 18-24h, observando-se e isolando-se colônias típicas conforme a técnica seguida. Os microrganismos isolados foram submetidos à identificação bioquímica: testes produção de gás, produção de H<sub>2</sub>S, Hidrólise da uréia, Desaminação do triptofano, motilidade, Descarboxilação da lisina, produção de indol e citrato (Pietrowski 2008; Silva *et al.* 2010; Dantas 2012).

### 2.3.4 Pesquisa de *Escherichia coli*.

Uma vez realizada a contagem de coliformes termotolerantes em tubos contendo caldo *E. coli* (EC) tendo confirmada a presença pela incubação a 45,5 °C, por 24-48 horas, esses tubos EC positivos foram utilizados para semeadura em placa contendo

ágar Eosina-azul de Metileno (EMB), incubadas a 37 °C, por 24h. As colônias que apresentaram centro negro e com brilho verde metálico foram repicadas em ágar Nutriente inclinado e incubadas a temperatura de 37 °C por 24h, em seguida manteve-se sob refrigeração (Silva *et al.* 2010; Dantas 2012).

### 3. Resultados e Discussão

#### 3.1 Local e dados de coleta

Realizou-se um levantamento de dados nas feiras da cidade, para verificar o fluxo de venda do queijo de coalho, em seguida foram selecionados dois pontos de venda na feira municipal, dos quais se coletou amostras e realizou-se análise em laboratório, sendo os lugares selecionados dois pontos (Figura 1). Nas visitas aos locais de venda, percebeu-se que a comercialização do queijo ocorre na maioria das vezes sem cuidados higiênico-sanitários, o transporte e recebimento do produto são efetuados sem refrigeração e o acondicionamento é sobre balcões á temperatura ambiente, em plena exposição, o que compromete a segurança microbiológica e a qualidade dos alimentos. Com a aplicação de questionários (Anexo) se obteve informações das inadequadas condições de higiene do leite utilizado, a deficiência nos procedimentos de sanitização de equipamentos e utensílios. O queijo de coalho é comercializado em bancas do mercado, feiras livres, supermercados, mercadinhos e padarias diretamente aos consumidores. A fabricação desse produto é simples e de baixo custo, é feito com técnicas que normalmente não estão normatizadas, uma vez que elas são adotadas de acordo com o entendimento e aprendizagem que cada produtor adquiriu ao longo de sua experiência. Outro ponto de destaque que põe em risco a qualidade sanitária do queijo é a forma de comercialização que ocorre sem a devida proteção a

agentes contaminantes, onde o comerciante o manuseia sem proteção, seja com o uso de luvas descartáveis, toucas ou aventais, propiciando um meio de contaminação direta. Além do mais os queijos não são normalmente embalados, sendo expostos ao ar livre, e quando recebe algum invólucro ele é inadequado, não garantindo a inocuidade do produto. Para a realização desse estudo, as amostras de queijo foram coletadas em dois balcões de venda na Feira do Produtor Rural na cidade de Itacoatiara - AM, caracterizados como os principais pontos comerciais e distribuidores de queijo, em virtude de essa ser a única feira do município que comercializar queijo, sendo a venda em grande escala. O fato de a maior parte das panificadoras da cidade realizarem a venda desse produto ocorreu uma mudança no objetivo sendo as coletas realizadas em apenas um local de venda – a feira, não mas em panificadoras, sendo em todos os pontos de venda acreditando-se obter um resultado mais significativo. Estes pontos de venda recebem produtos de no máximo três procedências, todas sendo de localidades próximas ao município, fato justificado e comprovado mediante aplicação de questionário (em anexo) junto aos comerciantes.

Os dados foram coletados nos meses de Fevereiro, Março, Abril, Maio e Junho do ano 2013, sendo sempre no horário da manhã no comércio varejista do município, após preparação e estudo para realizar a coleta das amostras adotando as recomendações na Instrução Normativa Nº 62 (BRASIL, 2003). A retirada de frações da peça inteira foi realizada pelo próprio comerciante utilizando a faca de costume, depois acondicionada em sacos plásticos e transportada em caixa isotérmica sem gelo (Figura 2), com a identificação de cada amostra e informações prestadas pelo comerciante, através do preenchimento de uma ficha de cadastro, previamente elaborada.

Ao chegarem ao laboratório às amostras foram imediatamente processadas e iniciou-se o processo de análise, realizadas no Laboratório de Microbiologia do Instituto de Ciências Exatas e Tecnologia - ICET/UFAM.

### 3.2 Análises microbiológicas

Este procedimento exige dedicação, responsabilidade e técnicas assépticas, uma vez que ações inadequadas podem gerar diagnósticos incompatíveis com a qualidade do produto examinado. Salotti *et al.* (2006) afirmam que tal procedimento deve ser encarado com certo rigor, pois só assim pode-se conhecer a existência de possíveis deficiências de manipulação, através da averiguação da presença de microrganismos indicadores de má qualidade higiênica e de microrganismos patogênicos, que implicariam em contaminação do alimento. Para a realização da análise microbiológica adotou-se a técnica preconizada pela American Public Health Association (APHA), onde a mesma deu-se em algumas etapas determinação do NMP/g de Coliformes Totais; pesquisa de Coliformes termotolerantes; *E. coli*; pelo método US Food and Drug Administration (FDA) para contagem de *Staphylococcus aureus* e pela ISO 6579:2007 da International Organization for Standardization, para pesquisa de *Salmonella* sp. Somente essas técnicas foram realizadas, devido à dificuldade de aquisição do kit bioquímico para teste de coagulase em *Staphylococcus aureus*, assim como, a pesquisa para verificar presença de *Listeria monocytogenes* na amostra a qual também não foi realizada.

A fim de evitar contaminação dos meios, haja vista o resultado da pesquisa exigir dados fidedignos, que retratem a qualidade do queijo comercializado e não dados de falha técnica decorrente de procedimentos inadequados ou inseguros, adotou-se técnica estéril em todas as etapas, utilizando para tal fim, desde a preparação até a semeadura, o

ambiente na circunferência do bico de Bunsen, além disso, as vidrarias foram esterilizadas em autoclaves a uma temperatura de 121 °C durante um período de 15 minutos para então serem utilizadas. Após cada manuseio das hastes e alças de platinas, a fim de garantir que as mesmas permanecessem estéreis, elas eram imediatamente flambadas em bico de Bunsen, durante o tempo necessário para que elas ficassem rubras. Para a determinação do Número Mais Provável por grama de Coliformes Totais, utilizou-se a técnica de tubos múltiplos, na qual foram utilizados nove tubos, agrupados de três em três conforme a diluição, e posteriormente agrupados para fazer a contagem utilizando a Tabela do Número Mais Provável por 100ml, para séries de 3 tubos com inóculos de 10 ml, 1,0 ml e 0,1 ml, e respectivos intervalos de confiança 95%.

Para tanto se adotou o seguinte procedimento: pesagem de 25g da amostra, que foi acondicionado em saco estéril e fechado, seguido da fragmentação manual da mesma, que na sequência foi colocada no frasco - balão Erlenmeyer com 225 ml de Água peptonada, sendo em seguida homogeneizada com movimentos circulares do frasco (Figura 2). Este procedimento foi adotado em cada uma das 6 amostras do estudo, sendo uma coleta por vez para evitar possíveis confusões, já que havia disponibilidade de material para toda semana. Com a homogeneização concluída, utilizando pipetas de graduação específica (10 e 1 ml) embaladas e esterilizadas individualmente, foi retirada do frasco Erlenmeyer (diluição  $10^{-1}$ ) 1ml da solução transferindo-se para tubo de ensaio contendo 9ml de AP (diluição  $10^{-2}$ ), da qual foi transferido 1ml para um segundo tubo contendo AP (diluição  $10^{-3}$ ), a partir dessas diluições a amostra foi inoculada em triplicata para tubos de ensaio contendo caldo Lauril e tubos Durhan invertidos, com o seguinte quantitativo de 1ml para os três tubos correspondentes a cada diluição. Vale ressaltar que este procedimento se deu em nove movimentos para cada amostra, sendo

realizados em baterias de pipetagem agrupadas em três para se evitar acidentes e nem correr o risco de aumentar a diluição, o que poderia interferir nos resultados. Destaca-se ainda que se teve o cuidado de realizar a identificação de cada tubo com o código da amostra (local e número da coleta), o meio utilizado e a diluição, a fim de evitar troca de amostras e viés de leitura, garantindo com isso a confiabilidade dos dados e a preservação da identidade do comerciante.

Na sequência procedeu-se a incubação dos tubos contendo Caldo Lauril (CL), que contém na sua composição triptose, fosfato de potássio, cloreto de sódio, lactose, fosfato monopotássico, lauril sulfato de sódio e água destilada. O processo de incubação deu-se por 24-48 horas a uma temperatura de  $35 \pm 2$  °C utilizando-se a estufa microbiológica. Este procedimento é realizado para propiciar o desenvolvimento microbiano, a partir do fornecimento de nutrientes, vindo do meio de cultura e pelas condições ambientais, por meio de conforto térmico ofertado pela estufa, que sejam propícios para proliferação e desenvolvimento do agente a ser pesquisado.

O CL é um meio rico em nutrientes que permite um rápido desenvolvimento de microrganismos fermentadores de lactose, considerado um meio de teste presuntivo para coliformes totais e termotolerantes. Na preparação deste meio foi seguida a técnica recomendada pelo fabricante. A fermentação da lactose presente no CL leva a produção de ácido e gás, sendo este último evidenciado pela formação de bolhas no interior do tubo de Durham (Figura 3), e segundo recomendação de Brasil (2003) são considerados como positivos a formação de gás mínima de 1/10 do volume total do referido tubo. A partir dos tubos positivos em Caldo Lauril Sulfato Triptose indicativo de contaminação pelo método presuntivo de coliformes totais, realizou-se o teste confirmativo, nos quais foi introduzida uma alçada de platina para a retirada da amostra do inoculado de cada



cultura, sendo a mesma transferida para tubos de Caldo Verde Brilhante (CVB) à 2% com tubos Durham invertidos, observou o crescimento com produção de gás e anotou o resultado (Figura 3) com leitura do Número Mais Provável (NMP/g) através da tabela confirmando a presença de coliformes totais. Na composição do CVB encontra-se água destilada, peptona, bile bovina, lactose e verde brilhante, e a partir dos sais biliares inibe o crescimento de bactérias gram positivas (Hajdenwurcel 1998), concomitantemente foi realizada a incubação em Caldo Echerichia coli (CEC), em cuja composição se encontra caseína, lactose, sais biliares, fosfato de potássio, fosfato monopotássico e cloreto de sódio. A incubação ocorreu a uma temperatura de 44- 45 °C durante 24 horas, no qual se observou o crescimento de bactérias anaeróbicas a partir da produção de gás (Figura 3) nos dois tipos de caldos. Justifica-se a utilização dos dois caldos (CVB e CEC), uma vez que ambos são utilizados como métodos confirmativos para coliformes totais e termotolerantes respectivamente. Os tubos que apresentaram produção de gás, identificados previamente com um número específico para cada amostra, teve a contagem de coliformes estimados e expressos em NMP/g de coliformes totais, a partir da tabela que determina esse número apropriado às diluições inoculadas.

Para dar continuidade a análise microbiológica foram preparadas placas de Petri para serem semeadas e a partir da formação de colônias típicas, identificar e confirmar a presença de *E. coli* e de *Salmonella* sp. Foram também preparadas placas com os meios BP e PCA para, através do plaqueamento em superfície, possibilitar a contagem de *Staphylococcus aureus* e de microrganismos aeróbios mesófilos respectivamente.

Na pesquisa de *E. coli* foi retirada uma alçada do CEC positivo para termotolerantes, e semeado em estrias sobre os meios ágar EMB, dispostos em placas de Petri, com um período de incubação de 24h a 35 °C, cuja identificação do microrganismo foi feita a partir da visualização de colônias típicas. Para a pesquisa de *Salmonella* sp. as amostra foram pré-enriquecidas em água peptonada a 1% (AP) e

incubadas a 37 °C por um período de 18 ± 2h. Após o término deste tempo iniciou-se processo de enriquecimento seletivo, onde foi transferido 1 ml da amostra diluída em AP para um tubo de ensaio contendo 10ml de Caldo Rappaport Vassiliadis (CRV), sendo os mesmos incubados a 42 °C durante 24h. Concluído o prazo de incubação foi iniciado o plaqueamento diferencial a partir dos produtos do tubo incubado no qual foi mergulhada hastes de platina, que foi utilizada para construir estrias na superfície de placas ágar Xilose-Lisina-Desoxicolato (XLD) e outra em um segundo meio – opcional (EMB). Concluída a semeadura das placas, as mesmas foram incubadas por 24h a uma temperatura de 37°C, cujo resultado final é determinado pelo aspecto do crescimento de colônias típicas.

Para *Staphylococcus aureus*, utilizou-se o método de contagem direta em placas, das três diluições da amostra foram inoculados 0,1ml de cada uma na superfície de placas de BP previamente preparadas e secadas, o inóculo foi espalhado com uma alça de Drigalski até que todo excesso de líquido fosse absorvido. As placas foram incubadas a 37 °C por 48 horas e foram selecionadas para contagem placas com 20 a 200 colônias típicas.

A contagem total de aeróbios mesófilos foi uma análise que se deu ao longo do trabalho, por isso não consta nos objetivos, decidiu-se acrescentar por ser um indicado geral da população bacteriana em alimentos. O método utilizado foi a contagem em placa onde também foi inoculado 0,1ml de cada diluição na superfície da placa e espalhadas com alça de Drigalski, a incubação se deu por 48 horas a uma temperatura de 32 °C seguida da leitura.

### 3.3) Análise de dados

Para a análise dos dados de termotolerantes, utilizou-se a tabela do Número Mais Provável (NMP/g) onde o meio utilizado para a confirmação do teste presuntivo de coliformes foi realizado, uma vez que entre os seus constituintes encontram-se os sais biliares, que inibem o desenvolvimento de organismos não coliformes. A formação de bolha no interior do tubo Durham, evidenciado na Figura 3, é um indicativo da produção de gás pela ação fermentativa da lactose por bactérias anaeróbicas que inclui os gêneros *Escherichia*, *Citrobacter*, *Enterobacter* e *Klebsiella*. E a partir dos resultados da análise microbiológica detectou-se que a presença de coliformes totais e termotolerantes ficaram acima de  $2,4 \times 10^3$  NMP/g, e a legislação brasileira vigente apresenta como limite máximo de tolerância para os referidos  $5 \times 10^2$  NMP/g. Conforme a distribuição dos dados infere-se que 100% da amostra encontra-se com coliformes apresentando valores superiores a 2.400 NMP/g, o que de acordo com as normas regulamentares (RDC 12), pode-se definir que o produto está impróprio para a comercialização e conseqüentemente para o consumo humano. Sendo interesse, também, de investigação neste estudo a presença de *E. coli*, visto que ela é estritamente fecal, faz-se necessário a identificação da mesma por plaqueamento em meio seletivo o qual se fez com a utilização de Agar Eosina Azul de Metileno (EMB), meio seletivo onde *E. coli* cresce abundantemente, apresentado uma característica típica que é cor verde metálico brilhante (Figura 4), diferente de outros microrganismo que também podem desenvolver-se neste meio sendo necessária a realização dos testes bioquímicos que confirmaram em 33,4% a espécie, através do enterokit contendo meios Mili, Epm e Citrato. A contagem de coliformes totais é utilizada como indicador higiênico, e a presença de coliformes 45° C e *E. coli* em 100 % das amostras indica que material fecal entrou em contato com o alimento, de forma direta ou indireta, o que implica dizer que

outros patógenos entéricos podem estar presentes no queijo. Com valores tão acima do estabelecido pela legislação, pode-se questionar a qualidade da matéria prima, e reafirmar a ausência das BPF, o que leva ainda a uma condição crítica, pois como as amostras foram coletadas em pontos comerciais, os produtos chegaram a mesa do consumidor sem o devido controle de qualidade, e estes muitas das vezes o consome cru, levando os patógenos diretamente ao seu trato intestinal, favorecendo assim a instalação de DTA.

Estudos realizados por Santana *et al* (2008) em Aracaju – SE e por Alves *et al* (2009) em São Luiz - MA reafirmam este achado, onde os resultados dos seus trabalhos apontam contaminação do queijo de coalho por coliformes totais e termotolerantes superiores ao definido pela legislação nacional, e os autores atribuem este fato as más condições de higiene no processo de produção. Estudos sobre a qualidade microbiológica de queijo-coalho relataram ocorrência de microrganismos patogênicos e contagem de microrganismos deterioradores em números que excedem, às vezes, os limites estabelecidos pela legislação. Dentre as bactérias patogênicas observadas destacam-se *Salmonella* sp, *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus* (Cavalcante *et al.* 2007).

A amostra 2F<sub>1</sub> apresentou presença de *Salmonella* sp. (Figura 4), já as outras amostras não. O que significa que 83,34% das amostras se encontravam em conformidade com a legislação vigente em relação a esse patógeno. Porém este dado, analisado isoladamente, não significa propriamente que os resultados sejam negativos para *Salmonella* sp., uma vez que, na cadeia biológica, uma espécie de determinado microrganismo pode destruir outra espécie, e para se ter uma resposta efetiva sobre este dado, seria necessário uma pesquisa sobre toda a cadeia produtiva. Pesquisas afirmam

que quando são adicionadas a alimentos bactérias iniciadoras, como a bactéria láctica, com a finalidade de melhorar a conservação, a segurança e as características sensoriais, elas podem acelerar o processo de maturação, e através da produção de ácido láctico no início da fermentação, diminuir o pH e inibir microrganismos indesejáveis como *Salmonella* sp., *Yersinia enterocolítica* e *Escherichia coli* (Balduino *et al.* 1999).

Para minimizar este problema, é recomendado que o queijo de coalho seja produzido com leite pasteurizado, fato regulamentado pela IN nº 30 e Portaria 146, que exclui da obrigatoriedade de tratamento térmico, os produtos submetidos a processo de maturação durante um tempo superior a 60 dias. Porém é fato comprovado que estas normas não são obedecidas nas unidades produtoras onde não existe o acompanhamento de órgãos de fiscalização, haja vista que a maioria da produção de queijo de coalho é realizada com leite cru.

Para diferenciação de *E. coli* e *Salmonella* sp, adotou-se a identificação de colônias típicas após plaqueamento e crescimento em meios seletivos usando à habilidade de produção de gás sulfídico, habilidade de fermentar carboidratos e descarboxilar a lisina presente no meio de cultura e confrontando a luz da literatura . A identificação de *E. coli* é possível pela visualização de colônias na cor verde com brilho metálico, como resultado da reação da eosina em meio com pH baixo devido a produção de ácido consequente da fermentação da lactose.

A contagem de *Staphylococcus aureus* e mesófilos se deram pelo crescimento de colônias típicas na superfície das placas (Figura 4) conforme orienta a metodologia para *Staphylococcus aureus*. É importante frisar que a contagem de mesófilos não diferencia tipos de bactérias, sendo utilizada para se obter informações gerais sobre a qualidade do produto, prática de manufaturas, matérias primas utilizadas, condições de processamento, manipulação e vida de prateleira. Não é indicador de segurança, pois

não esta diretamente relacionado a presença de patógenos ou toxinas. Pode ser útil na avaliação da qualidade, porque populações altas de bactérias podem indicar deficiência na sanitização ou falha no controle do processo. Para uma melhor visualização dos dados, os mesmos foram agrupados em tabela a fim de facilitar a interpretação.

#### 4. Conclusões

A partir dos resultados obtidos, verificou-se que a amostra encontra-se positiva para coliformes totais e termotolerantes apresentando valores superiores a 2.400 NMP/g, e a legislação brasileira vigente apresenta como limite máximo de tolerância para os referidos  $5 \times 10^2$  NMP/g indicando que houve contaminação de origem fecal, foi positivo, ainda, para uma amostra a presença de *Salmonella* sp. e para duas outras a presença de *Escherichia coli* que são bactérias patogênicas. Mediante estes problemas, pode-se afirmar que isso decorre da ausência de fiscalização, da liberdade de ação e da ausência das BPF, regras de higiene que, se bem aplicadas, controlam, amenizam ou ainda, eliminam a contaminação dos alimentos por agentes patogênicos (biológicos, físicos e/ou químicos), e sendo assim devem ser obedecidas pelos manipuladores desde a escolha e compra da matéria prima para o preparo do alimento, até a venda para o consumidor final, compreendendo assim toda a cadeia produtiva.

#### 4. Agradecimentos

A Deus, pela vida concedida e pela vida de meus pais que sempre me incentivam na fase acadêmica e não medem esforços para que cresça na busca pelo conhecimento. A Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação/ UFAM por financiar este projeto e a Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado do Amazonas – FAPEAM pelo apoio financeiro.

Ao meu orientador MSc. Alúzio Gonçalves Brasil Jr. por todo apoio e sempre ter estado á disposição, buscando o bom andamento do projeto.

## 5. Referências

Agencia Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Resolução RDC nº 12 de 02

Janeiro de 2001 ([www.anvisa.gov.br](http://www.anvisa.gov.br)). Acesso em 31/03/2012.

Balduino, R., Oliveira, A. S. de, Haully, M. C. de O. 1999. Cultura láctica mista com potencial de aplicação como cultura iniciadora em produtos cárneos. *Ciênc. Tecnol. Aliment.* vol.19 n.3 Campinas, Sept. / Dec. ([www.scielo.br/scielo](http://www.scielo.br/scielo)) Acesso em 31/03/2012.

Beux, 2011. Apostila de Tecnologia de Leite e Derivados. Universidade Tecnológica Federal do Paraná ([www.ebah.com.br/content/ABAAAA7PYAF/apostila-tecnologia-leite-derivados](http://www.ebah.com.br/content/ABAAAA7PYAF/apostila-tecnologia-leite-derivados)). Acesso em 31/03/2012.

Brasil. Ministério da Agricultura. Portaria nº 146, de 7 de março de 1996. Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Queijos. *Diário Oficial da República Federativa do Brasil*, Brasília, DF.

Brasil, 2008. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento ([www.agricultura.gov.br/das/req.queijomozzarella](http://www.agricultura.gov.br/das/req.queijomozzarella)). Acesso em 31/03/2012.

Catao, R.M.R.; Ceballos, B.S.O. 2001. Pesquisa de *Listeria* spp, coliformes totais e fecais e *E. coli* no leite cru e pasteurizado de uma indústria de laticínios, no estado da Paraíba - Brasil. *Cienc. Tecnol. Aliment*, 21:281-287.

Cavalcante, J.F.M. *et al.* Processamento do queijo coalho regional empregando leite pasteurizado e cultura láctica endógena. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, Campinas, 27(1): 205-214, jan.-mar. 2007.

Hajdenwurcel, J. R. 1998. *Atlas de microbiologia de alimentos*. Fonte Comunicação. Vol1 ed. São Paulo, 1998, 66p.

Dantas, D.S. 2012. *Qualidade microbiológica do queijo de coalho comercializado no município de patos, PB*. Dissertação de Mestrado em Zootecnia, Centro de Saúde e Tecnologia Rural/ Universidade Federal de Campina Grande Grande, Patos, Paraíba. 46p.



Nogueira, J. G. 2006. A embalagem como fator de agregação de valor ao produto: Um estudo do segmento de queijos em Juiz de Fora. Dissertação de mestrado, Área Sistema de Gestão pela Qualidade Total/ Universidade Federal Fluminense, Niterói.

Peixoto, A.M.S.; Praça, E.F.; Góis, V.A. 2007. A potencialidade microbiológica de coagulação do coalho líquido artesanal. *Revista Verde*, 2: 52 – 64.

Pietrowski, G.A.M.; Ranthum, M.; Crozeta, T.; Jonge, V. 2008. Avaliação da qualidade microbiológica de queijo tipo mussarela comercializado na cidade de ponta grossa, paraná. *Revista Brasileira de Tecnologia Agroindustrial*, 2: 25-31.

Ramos, S. N. M.; Costa, C. A. 2003. Ocorrência de *Listeria monocytogenes* em queijo artesanal tipo coalho comercializado na cidade de Manaus-AM, Brasil. *Acta Amazonica*, vol.33 no.4 Manaus.

Santana, R. F. et al, 2008. Qualidade microbiológica de queijo-coalho comercializado em Aracaju, SE. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec*, 6: 1517-1522.

Silva, N.; Junqueira, V.C.A.; Silveira, N.F.A.; Taniwaki, M.H.; Santos, R.F.S.; Gomes, R.A.R. 2010. *Manual de Métodos de Análise Microbiológica de Alimentos e Água*.

Livraria Varela, São Paulo, 2010, 138p.

## 6. Figuras



Figura 1. Queijo de coalho em seus locais de venda, de onde foram feitas as coletas - feira Municipal de Itacoatiara.



Figura 2. Forma de transporte da amostra em caixa isotérmica, homogeneização em saco estéril e diluição em erlenmeyer.



Figura 3. Formação de bolha no interior do tubo Durham, indicando positividade para CL, VB e EC.

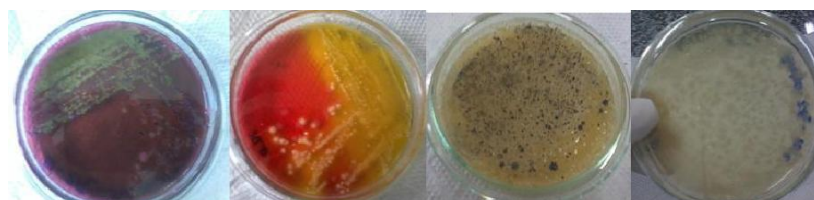


Figura 4. Placas com meio EMB, XLD, BP e PCA após incubação, indicando crescimento característico de *E. coli*, *Salmonella*, *Staphylococcus aureus* e Mesófilo respectivamente.

7. Tabela

Tabela 1. Contagens de coliformes totais e fecais pelo método do Numero Mais Provável.

<b>Nº da Amostra</b>	<b>Código amostra</b>	<b>Coliformes totais (NMP/g)</b>	<b>Coliformes a 45°C (NMP/g)</b>	<b><i>E.coli</i> (Teste.bioq)</b>	<b><i>Salmonella</i> (Teste.bioq)</b>	<b><i>Staphylococcus aureus</i> (Contagem)</b>	<b>Aeróbio Mesófilos (Contagem)</b>
1	F1	>2.400	>2.400	Ausente	Ausente	-	<2x10 <sup>6</sup>
2	F2	>2.400	>2.400	Presente	Ausente	69x10 <sup>4</sup>	784x10 <sup>4</sup>
3	F3	>2.400	>2.400	Presente	Ausente	169x10 <sup>4</sup>	<2x10 <sup>6</sup>
4	2F <sub>1</sub>	>2.400	>2.400	Ausente	Presente	<2x10 <sup>6</sup>	<2x10 <sup>6</sup>
5	2F <sub>2</sub>	>2.400	>2.400	Ausente	Ausente	<2x10 <sup>6</sup>	15x10 <sup>5</sup>
6	2F <sub>3</sub>	>2.400	>2.400	Ausente	Ausente	18x10 <sup>4</sup>	15x10 <sup>5</sup>

F<sub>1</sub>: coleta da feira 1; F<sub>2</sub>: coleta da feira 2; F<sub>3</sub>: coleta da feira 3; 2F<sub>1</sub>: coleta do segundo ponto da feira.

Tabela 2. Resultado dos testes bioquímicos da ultima coleta.

MEIO		<i>E. Coli</i> (padrão)	DIL. 10 <sup>-1</sup>	DIL. 10 <sup>-2</sup>	DIL. 10 <sup>-3</sup>	<i>Salmonella sp.</i> (padrão)	Meio XLD	Meio EMB
1. EPM	Produção de Gás	+/-	+	+	+	+	-	-
	Produção de H <sub>2</sub> S	-	-	-	-	+	+	+
	Hidrólise da Uréia	-	+	-	-	-	+	+
	Desaminação do Triptofano (LTD)	-	+	-	-	-	+	+
2. MILI								
	Motilidade (MOT)	-	+	+	+	+	+	+
	Descarboxilação da lisina	-	-	-	-	+	-	-
	Produção de indol	+	+	+	-	-	+	-
3. Citrato de Simmons		-	-	-	+		+	-

Dil: Diluição por 10, 100 ou 1000; (+): positivo; (-): negativo

## 7.1 Cronograma de Execução

<b>DESCRIÇÃO</b>	<b>AGO. E SET. 2012</b>	<b>OUT. E NOV.</b>	<b>DEZ. E JAN. 2013</b>	<b>FEV. E MAR.</b>	<b>ABR. E MAI.</b>	<b>JUN. E JUL.</b>
Revisão bibliográfica	X	X				
Levantamento de Dados (Panificadoras da Cidade)	X	X				
Treinamento da técnica		X				
Aquisição de material		X	X			
Preparo de material				X		
Coleta de amostras				X	X	X
Processamento e análise das amostras				X	X	X
Elaboração de relatório Parcial			X			
Elaboração do Resumo e Relatório Final					X	X
Elaboração da Apresentação Final.						X

## ANEXO

Número da amostra (Cód):

Data da coleta:

Horário da coleta:

1. Nome do comerciante:

---

2. Endereço comercial:

---

---

3. Qual o local de procedência do queijo? (Ex. Fazenda, Comunidade, Villa)

---

---

4. O local possui CNPJ? Qual?

---

---

5. Qual o nome do fornecedor?

---

6. Qual o meio de transporte?

---

7. O queijo vem embalado? Como?

---

8. Qual a quantidade transportada?

---

9. Qual a forma de acondicionamento?

---

10. Qual a origem do leite usado para produzir o queijo?

---

---