



AValiação DA QUALIDADE MICROBIOLÓGICA DE QUEIJOS COLONIAIS PRODUZIDOS DO RIO GRANDE DO SUL

Andréa Karoline Mascitti¹
Cristina Bergman Zaffari Grecelle²
Letícia Silva³
Jane Mendez Brasil⁴
Vagner Ricardo Lunge⁵

Resumo

O queijo colonial é produzido com leite não pasteurizado e portanto deve seguir normas rigorosas de higiene durante a fabricação, visando evitar o crescimento de micro-organismos patogênicos e deteriorantes. Os principais contaminantes microbianos em queijos são bactérias como *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes* e *Salmonella* sp. O presente estudo teve como objetivo realizar uma análise da qualidade microbiológica de amostras de queijos coloniais provenientes de diferentes fábricas de produção de queijo colonial localizadas em diferentes mesorregiões do estado do Rio Grande do Sul. Um total de 130 amostras foram coletadas e submetidas para avaliação microbiológica. Os resultados mostraram ausência de *Salmonella* sp em todas as amostras. Coliformes 45°C e *Staphylococcus* coagulase positiva foram considerados positivos em 29,6% ($1,2 \times 10^5$ UFC g⁻¹) e 40,0% ($6,0 \times 10^4$ UFC g⁻¹) das amostras totais, respectivamente. Especificamente *Listeria monocytogenes* foi detectada em três amostras (2,3%) sendo confirmada por PCR. A análise estatística revelou que não houve correlação significativa na comparação da frequência de micro-organismos e o processo de produção, as mesorregiões de origem e o tempo de maturação. Entretanto, a ocorrência de casos de coliformes termotolerantes e estafilococos coagulase positivos acima do nível tolerado e a detecção de três casos positivos de *Listeria monocytogenes* demonstram a importância de estabelecer critérios para avaliação microbiológica de queijos coloniais e valorização deste produto no Rio Grande do Sul.

INTRODUÇÃO

O queijo colonial é um produto característico do interior do Rio Grande do Sul e sua produção está ligada ao modo tradicional de fabricação e ao ambiente em que são produzidos, expressando a cultura local e a história das famílias. Estima-se que a produção anual gire em

¹ Aluno do curso de graduação Medicina Veterinária – Bolsista PROBITI/FAPERGS
andreakaroline88@hotmail.com

² Professor do curso de graduação Medicina Veterinária - czaffarigrecelle@gmail.com

³ Aluna do PPG Doenças Infecciosas e Parasitárias (ULBRA)

⁴ Técnica do Laboratório de Microbiologia Veterinária (ULBRA)

⁵ Professor do curso de graduação do curso de Medicina Veterinária e PPGBioSaúde– lunge@ulbra.br

torno de 2,3 toneladas por propriedade do estado. Esta produção diária representa uma importância financeira significativa na renda das propriedades produtoras (RIES, 2012).

A fabricação do queijo colonial deve seguir normas rigorosas de higiene, com utilização de matéria-prima (leite) originária de animais em boas condições sanitárias. Condições precárias nas fazendas de gado leiteiro, como a ausência de antissepsia dos úberes antes da ordenha e emprego da ordenha manual, aumentam o risco de contaminação do leite e consequentemente do queijo produzido (JAY, 2005). Além disso, a manipulação direta da coalhada para a verificação da coagulação durante a produção aumenta a possibilidade de veiculação de micro-organismos ao alimento.

Entre os micro-organismos que podem ser encontrados no queijo estão os coliformes totais (detectados após incubação à 35°C) e os termotolerantes (detectados com incubação à 45°C), *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes* e *Salmonella* sp. A ocorrência de coliformes a 35°C é aceitável e indica contaminação de origem ambiental, e a de coliformes a 45°C indica contaminação de origem fecal, tendo a *Escherichia coli* como seu principal indicador. Ambos, quando os níveis apresentam-se elevados, mostram que as condições higiênico-sanitárias ou de processamento do alimento foram inadequadas. A pesquisa específica dos dois demais agentes apresenta grande relevância para saúde pública, uma vez que são capazes de causar e toxinfecções alimentares (MELO, 2013). Dentre as DTA's (doenças transmitidas por alimentos), destacam-se a listeriose, que tem como agente etiológico a *Listeria monocytogenes* e a estafiloenterotoxemia causado por *Staphylococcus aureus*.

A legislação brasileira estabelece critérios microbiológicos para diferentes grupos de produtos alimentícios. Sendo o queijo colonial um produto com umidade em torno de 46%, ele poderá apresentar os seguintes padrões microbiológicos, expressos em unidade formadora de colônias (UFC): coliformes a 45°C ($\leq 10^3$ UFC/g), *Staphylococcus* coagulase positiva ($\leq 10^3$ UFC/g), *Listeria monocytogenes* (ausente/25g) e *Salmonella* sp (ausente/25g). Segundo a ANVISA, não há um limite para coliformes 35°C, porém o seu isolamento é necessário para contagem de coliformes 45°C pois é um indicador de contaminação pós processamento (BRASIL, 2001).

O presente estudo teve como objetivo avaliar a qualidade microbiológica de queijos coloniais, realizando uma análise quantitativa de coliformes e estafilococos, além de detecção de *Listeria* e *Salmonella*, em amostras deste produto obtidas de diferentes fabricantes.

METODOLOGIA

Amostras

Entre junho de 2016 e abril de 2017, foram coletadas e analisadas amostras de queijo colonial provenientes de 130 produtores de pelo menos 53 cidades (havia onze amostras sem informação de proveniência) localizadas em quatro mesorregiões (Centro Ocidental, Metropolitana de Porto Alegre, Nordeste e Sudoeste) do estado do Rio Grande do Sul. No momento da coleta, todas as amostras tiveram sua data de fabricação e temperatura verificadas. Após foram identificadas, acondicionadas em sacos plásticos previamente esterilizados e mantidas sob condições de refrigeração até a análise. Antes das análises, foi calculado o tempo de maturação de cada amostra (variando entre 3-84 dias, com média de 16,8 dias).

Análises microbiológicas

Todas amostras foram submetidas a procedimentos de análise microbiológica para contagem de coliformes à 35°C (totais), coliformes à 45 °C (termotolerantes) e detecção de *Staphylococcus* coagulase positiva, *Listeria* sp, *L. monocytogenes* e *Salmonella* sp. As

técnicas de quantificação de coliformes e a detecção de *Listeria* sp / *L. monocytogenes* foram realizadas conforme previamente descrito (ZAFFARI, 2007), com modificações como a não utilização do ágar Palcam e a substituição do ágar triptona de soja por ágar sangue. A identificação e quantificação de *Staphylococcus* coagulase positiva e a detecção de isolados de *Salmonella* foram realizadas segundo o método de US FDA-BAM (REGINALD; LANCETTE, 2001).

Detecção molecular de *Listeria monocytogenes*

O DNA foi extraído a partir de isolados de *Listeria* sp e *L. monocytogenes* semeados em ágar sangue utilizando o kit comercial NewGene PreAmp (Simbios Biotecnologia). A detecção do DNA de *L. monocytogenes* foi realizada pela reação em cadeia da polimerase em tempo real (qPCR) utilizando o conjunto de reagentes comerciais NewGene LMOAmp (Simbios Biotecnologia, Cachoeirinha, Brasil). A amplificação foi realizada em termociclador StepOne Plus (Applied Biosystems, Carlsbad CA, EUA) e os resultados foram avaliados pela presença/ausência de curvas de amplificação e determinação dos respectivos valores de ciclo de leitura das fluorescências (Ct - *Cycle threshold*).

Análise Estatística

Foi empregado o teste de qui-quadrado de Pearson, com um nível de significância de 5%, para avaliar possíveis diferenças nas frequências das variáveis qualitativas. Um valor de $P < 0,05$ foi considerado como estatisticamente significativo.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

As análises microbiológicas demonstraram que 119 (91%) amostras apresentaram contagem de coliformes 35°C, com valores variando de $2,0 \times 10^2$ a $1,1 \times 10^8$ UFC g⁻¹ ($2,2 \times 10^5$ UFC g⁻¹) e onze (9%) amostras foram negativas (ausente). Na contagem de coliformes 45°C, 38 amostras (29,6%) apresentaram contagem entre $5,0 \times 10^3$ e $3,3 \times 10^7$ UFC g⁻¹ ($1,2 \times 10^5$ UFC g⁻¹ - acima do limite permitido), quatro entre $2,0 \times 10^2$ e 10^3 UFC g⁻¹ e 88 não tiveram crescimento. Em relação a *Staphylococcus* coagulase positiva, 52 amostras (40,0%) obtiveram concentração entre $2,0 \times 10^3$ e $4,7 \times 10^7$ UFC g⁻¹, ($6,0 \times 10^4$ UFC g⁻¹ - acima do limite permitido) sendo seis com contagem a 1×10^3 UFC g⁻¹ e 72 foram ausentes. A *Listeria* spp foi detectada em 16 amostras (12,3%). As provas bioquímicas demonstraram sete (5,4%) *L. innocua*, duas (1,5%) *L. welshmeri*, três (2,3%) *L. monocytogenes*. Não foi possível identificar a espécie nas demais quatro (3,1%) amostras que foram denominadas *Listeria* sp. Todos os isolados foram submetidos a amplificação e detecção específica de *L. monocytogenes* por PCR, sendo que as meias três amostras foram positivas. *Salmonella* spp. não foi detectada em nenhuma amostra.

Os resultados das análises microbiológicas foram comparados com as seguintes variáveis: processo de produção (Tabela 1), mesorregiões de origem (Tabela 2) e tempo de maturação (Tabela 3).

Os resultados demonstram que não houveram diferenças estatísticas dos dados das análises microbiológicas e as demais variáveis (processo de produção, regiões do estado, maturação). Entretanto, pode-se observar uma qualidade microbiológica mais baixa nos queijos coloniais produzidos de forma caseira em relação aos processos agroindustriais, conforme observado para os maiores contagens médias de coliformes termotolerantes e estafilococos coagulase positiva além de um maior índice de positividade na detecção de *Listeria*. Especificamente com relação a *L. monocytogenes*, a presença desta bactéria foi demonstrada em três amostras. Outras espécies de *Listeria* foram detectadas em mais 13 amostras, indicando a possibilidade de ocorrência de *L. monocytogenes* nestas amostras. Os

resultados demonstram a importância de estabelecer critérios para que se possa continuar avaliando esse alimento, promovendo um controle sanitário visto que patógenos de relevância de saúde pública foram detectados.

Tabela 1. Comparação dos resultados microbiológicos com os processos de produção. Os dados de coliformes termotolerantes (à 45°C) e estafilococos coagulase positivos referem-se ao número de casos fora do padrão aceitável.

Processo de produção	Coliformes 45°C	χ^2 (P*)	S. Coagulase +	χ^2 (P*)	Listeria Spp	χ^2 (P*)
Caseiro	19/59 (32,2%)		27/59 (45,8%)		11/59 (18,6%)	
Agroindústria	4/26 (15,4%)	3,028 (0,220)	8/26 (30,7%)	1,832 (0,400)	2/26 (7,7%)	5,785 (0,216)
NI	15/45 (33,3%)		17/45 (37,8%)		3/45 (6,7%)	

*Valor de P.

NI: Não informado.

Tabela 2. Comparação dos resultados microbiológicos com as mesorregiões de origem. Os dados de coliformes termotolerantes (à 45°C) e estafilococos coagulase positivos referem-se ao número de casos fora do padrão aceitável.

Mesorregiões	Coliformes 45°C	χ^2 (P*)	S. Coagulase +	χ^2 (P*)	Listeria Spp.	χ^2 (P*)
Centro Ocidental Rio-Grandense	8/22 (36,4%)		10/22 (45,5%)		5/22 (22,7%)	
Metropolitana de Porto Alegre	8/25 (32,0%)		8/25 (32,0%)		3/25 (12,0%)	
Nordeste Rio-Grandense	17/63 (27,0%)	4,989 (0,288)	27/63 (42,9%)	8,168 (0,086)	8/63 (12,6%)	9,293 (0,318)
Sudoeste Rio-Grandense	5/12 (41,7%)		7/12 (58,3%)		0/12 (0,0%)	
NI	0/8		0/8		0/8	

*Valor de P.

NI: Não informado.

Tabela 3. Comparação dos resultados microbiológicos com os dias de maturação. Os dados de coliformes termotolerantes (à 45°C) e estafilococos coagulase positivos referem-se ao número de casos fora do padrão aceitável.

Dias de maturação	Coliformes 45°C	χ^2 (P*)	S. Coagulase +	χ^2 (P*)	Listeria Spp.	χ^2 (P*)
0 - 10	9/32 (28,1%)		10/32 (31,3%)		1/32 (3,1%)	
11-20	15/49 (30,6%)		20/49 (40,8%)		9/49 (18,3%)	
>20	10/35 (28,6%)	0,740 (0,995)	15/35 (42,9%)	1,737 (0,629)	5/35 (14,2%)	9,075 (0,169)
NI	4/14 (28,6%)		7/14 (50,0%)		1/14 (7,1%)	

*Valor de P.

NI: Não informado

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Esse estudo indica que há necessidade de melhoria das condições higiênicas na fabricação dos queijos coloniais. Logo, se percebe a necessidade de orientar os produtores quanto à importância da implementação das normas básicas de higiene durante todo o processo de produção para adequação da qualidade do produto que está sendo produzido.

AGRADECIMENTOS

Aos produtores pela concessão das amostras e a EMATER pela coleta.

REFERÊNCIAS

BENNETT, R.W.; LANCETTE, G.A. *Staphylococcus aureus*. In: FOOD DRUG ADMINISTRATION. **Bacteriological analytical manual**, 2001. Disponível em: < <http://www.cfsan.fda.gov/~ebam/bam-12.html>>. Acesso em: 27 mai. 2017.

BRASIL. Ministério de Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA. RDC nº 12, de 2 de janeiro de 2001. Regulamento Técnico sobre os padrões Microbiológicos para alimentos. Brasília-DF, 2001

JAY, J. M. Listerioses de Origem Animal. In: JAMES M. JAY (6.ed). **Microbiologia de Alimentos**. Porto alegre: Artmed, 2005, cap.25, p. 517-542.

MELO, F.D. et al Avaliação da inocuidade e qualidade microbiológica do queijo artesanal serrano e sua relação com as variáveis físico químicas e o período de maturação. **Acta Veterinária Brasileira**, Porto alegre, v. 41, 2013.

RIES, J. E et al. Projeto de qualificação e certificação do queijo serrano produzido nos Campos de Cima da Serra do Rio Grande do Sul - relato parcial da experiência. **Agroecologia e Desenv. Rural Sustentável**, Porto Alegre, v. 5, n. 1, p. 10-19, jan-abr. 2012

ZAFFARI, C.B; MELLO, J.F. Qualidade bacteriológica de queijos artesanais comercializados em estradas do litoral norte do Rio Grande do Sul. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.37, n.3, p. 862-867, mai-jun 2007.