



UNIVERSIDADE FEDERAL DE LAVRAS

**MONITORAMENTO DE PERIGOS E  
PONTOS CRÍTICOS DE CONTROLE E  
ESTIMATIVA DE RISCOS EM UMA  
INDÚSTRIA MINEIRA DE  
PÃO DE QUEIJO**

**ELAYNE CRISTINA MACHADO**

**2001**

53025

37523 MFW

**ELAYNE CRISTINA MACHADO**

**MONITORAMENTO DE PERIGOS E PONTOS CRÍTICOS  
DE CONTROLE E ESTIMATIVA DE RISCOS EM UMA  
INDÚSTRIA MINEIRA DE PÃO DE QUEIJO**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Curso de Mestrado em Ciência dos Alimentos, para obtenção do título de "Mestre".

Orientadora

Prof.ª Dr.ª Eliana Pinheiro de Carvalho

**LAVRAS  
MINAS GERAIS - BRASIL  
2001**

**Ficha Catalográfica Preparada pela Divisão de Processos Técnicos da  
Biblioteca Central da UFLA**

**Machado, Elayne Cristina**

Monitoramento de perigos e pontos críticos de controle e estimativa de riscos em uma indústria mineira de pão de queijo / Elayne Cristina Machado. -- Lavras : UFLA, 2001.

130 p. : il.

**Orientadora: Eliana Pinheiro de Carvalho.**

**Monografia – UFLA.**

**Bibliografia.**

**1. Pão de queijo. 2. HACCP. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.**

**CDD-641.815**

**ELAYNE CRISTINA MACHADO**

**MONITORAMENTO DE PERIGOS E PONTOS CRÍTICOS DE  
CONTROLE E ESTIMATIVA DE RISCOS EM UMA INDÚSTRIA  
MINEIRA DE PÃO DE QUEIJO**

Dissertação apresentada à Universidade Federal  
de Lavras, como parte das exigências do Curso  
de Mestrado em Ciência dos Alimentos, para  
obtenção do título de “Mestre”.

**APROVADA em 28 de dezembro de 2001**

**Dr. Maria Lúcia Pereira**

**FUNED**

**Prof. Dr<sup>a</sup> Roberta Hilsdorf Piccoli do Vale**

**UFLA**

  
**Prof. Dr<sup>a</sup> Eliana Pinheiro de Carvalho**  
**UFLA**  
**(Orientadora)**

**LAVRAS  
MINAS GERAIS - BRASIL**

**DEDICO a Deus**

**OFEREÇO**

**à minha família e ao meu noivo**

---

**Aos meus irmãos pela paciência e ajuda. Valeu Robson e Junior.**

**À minha irmã Renata pela força e principalmente pelo exemplo de coragem.**

**Ao meu noivo Sandro Luiz de Sá Souza pela paciência, pela ajuda, pelas distrações, pelo carinho e principalmente por estar ao meu lado sempre. Te amo de montão.**

**Aos amigos Virgílio Gasparini (Economista), Pedro Lins Mesquita, Carolina Pereira Lins Mesquita e Maria Odete Ferreira Gonçalves pela paciência, ajuda, pelos almoços e pelas brincadeiras. Valeu.**

**Aos meus familiares que torceram por mim e suportaram minha ausência, amo todos vocês.**

**À minha amiga Marlúcia, por toda ajuda, cooperação e principalmente carinho.**

**Às minhas colegas de Lavras, Renata e Ana Maria, por toda ajuda e carinho.**

**E a todos que de alguma forma me ajudaram a alcançar este objetivo.**

## **AGRADECIMENTOS**

À Profª Drª Eliana Pinheiro de Carvalho pela oportunidade e paciência.

À Drª Maria Lúcia Pereira pela oportunidade, carinho, paciência, incentivo e colaboração (Lú, te adoro).

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG); à Federação das Indústrias do Estado de Minas Gerais (FIEMG) e ao Instituto Evaldo Lodi (IEL) pelo apoio financeiro para realização deste projeto.

À Indústria Mineira de pão de queijo (IMPq) pela oportunidade da realização deste projeto. Obrigada a todos os funcionários.

À Fundação Ezequiel Dias (FUNED) Belo Horizonte pela oportunidade da realização deste projeto.

À minha amiga e colaboradora Gláucia Celeste Amâncio (FUNED), que me ajudou nas horas mais difíceis. Muito obrigada por tudo e conte comigo.

Aos pesquisadores da FUNED, obrigada pela ajuda.

Aos amigos do Setor de Anaeróbios e Epidemiologia Molecular, onde tive oportunidade de realizar minhas pesquisas.

Aos amigos Mayra, Rita, Zé Ricardo e Virginia pela paciência e qualquer ajuda.

Aos amigos do Setor de produção de meio de cultura (FUNED), na pessoa de Maria das Graças Leal, muito obrigada pelo pronto atendimento dos meios.

Ao departamento de Ciência dos Alimentos da Universidade Federal de Lavras, UFLA pela boa convivência.

Aos pesquisadores e funcionários do Departamento de Biologia da UFLA, obrigada por tudo.

Aos meus pais, Selma Maria Machado e Geraldo Luiz do Carmo Machado, pela paciência, confiança, amor, carinho e compreensão. Amo muito vocês.

Aos meus irmãos pela paciência e ajuda. Valeu Robson e Junior.

À minha irmã Renata pela força e principalmente pelo exemplo de coragem.

Ao meu noivo Sandro Luiz de Sá Souza pela paciência, pela ajuda, pelas distrações, pelo carinho e principalmente por estar ao meu lado sempre. Te amo de montão.

Aos amigos Virgílio Gasparini (Economista), Pedro Lins Mesquita, Carolina Pereira Lins Mesquita e Maria Odete Ferreira Gonçalves pela paciência, ajuda, pelos almoços e pelas brincadeiras. Valeu.

Aos meus familiares que torceram por mim e suportaram minha ausência, amo todos vocês.

À minha amiga Marlúcia, por toda ajuda, cooperação e principalmente carinho.

Às minhas colegas de Lavras, Renata e Ana Maria, por toda ajuda e carinho.

E a todos que de alguma forma me ajudaram a alcançar este objetivo.



## SUMÁRIO

	<b>Página</b>
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS.....	i
CAPÍTULO 1: Monitoramento de perigos e pontos críticos de controle e estimativa de riscos em uma Indústria Mineira de pão de queijo .....	01
1 Resumo Geral.....	02
2 General Summary.....	04
3 Introdução Geral.....	06
4 Referencial Teórico .....	10
4.1 O pão de queijo.....	10
4.2 Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle (APPCC).....	11
4.3 Principais agentes patogênicos enfocados na pesquisa.....	13
4.3.1 <i>Listeria monocytogenes</i> .....	13
4.3.2 <i>Salmonella</i> sp.....	15
4.3.3 <i>Staphylococcus aureus</i> .....	17
5 Referências Bibliográficas.....	20
CAPÍTULO 2: Identificação de perigos e pontos críticos de controle e avaliação das práticas de fabricação em uma Indústria Mineira de pão de queijo.....	24
1 Resumo .....	25
2 Summary.....	26
3 Introdução.....	27
4 Material e Métodos.....	28
4.1 Identificação de PCC e avaliação das práticas de produção em uma IMpq .....	28
5 Resultados e Discussão.....	31
5.1 Área de produção e processamento.....	31
5.2 Equipamentos e utensílios.....	31
5.3 Manipuladores.....	32

5.4 Matéria-prima.....	32
5.5 Outros .....	33
6 Referências Bibliográficas .....	35
<b>CAPÍTULO 3: Monitoramento da qualidade microbiológica em uma Indústria Mineira de pão de queijo – Superfícies de equipamentos e utensílios.....</b>	<b>37</b>
1 Resumo .....	38
2 Summary.....	39
3 Introdução.....	40
4 Material e Métodos.....	42
4.1 Avaliação dos procedimentos de higienização de superfície de equipamentos e utensílios adotados na IMpq .....	42
4.2 Avaliação microbiológica de superfícies de equipamentos e utensílios higienizados.....	42
4.2.1 Tomada de amostras .....	42
4.2.2 Enumeração de bactérias aeróbias mesófilas, segundo Vanderzant & Splittstoesser (1992).....	43
4.2.3 Determinação do Número Mais Provável (NMP) de coliformes totais e fecais, segundo Vanderzant & Splittstoesser (1992).....	44
4.2.4 Enumeração de estafilococos produtores e não produtores de coagulase, segundo Vanderzant & Splittstoesser (1992)....	44
5 Resultados e Discussão.....	45
6 Referências Bibliográficas .....	50
<b>CAPÍTULO 4: Pesquisa de estafilococos enterotoxigênicos em manipuladores de uma Indústria Mineira de pão de queijo .....</b>	<b>51</b>
1 Resumo .....	52
2 Summary.....	53
3 Introdução.....	54
4 Material e Métodos.....	56
4.1 Tomada de amostras .....	56
4.2 Pesquisa de estafilococos enterotoxigênicos .....	57

4.2.1 Caracterização morfológica e bioquímica de estafilococos.....	57
4.2.2 Produção e detecção de enterotoxinas estafilocócicas.....	57
5 Resultados e Discussão.....	59
6 Referências Bibliográficas.....	61
<b>CAPÍTULO 5: Monitoramento da qualidade microbiológica em uma</b>	
<b>Indústria Mineira de pão de queijo – Matéria-prima, produto</b>	
<b>intermediário e final.....</b>	<b>63</b>
1 Resumo.....	64
2 Summary.....	66
3 Introdução.....	67
4 Material e Métodos.....	69
4.1 Coleta e preparo das amostras.....	73
4.2 Água tratada.....	73
4.2.1 Determinação do Número Mais Provável (NMP) de coliformes totais e fecais, segundo Vanderzant & Splittstoesser (1992).....	73
4.2.2 Enumeração de bactérias aeróbias mesófilas, segundo Vanderzant & Splittstoesser (1992).....	74
4.3 Matéria-prima.....	74
4.3.1 Metodologia microbiológica.....	75
4.3.1.1 Enumeração de <i>Bacillus cereus</i> .....	75
4.3.1.2 Enumeração de bactérias aeróbias mesófilas, segundo Vanderzant & Splittstoesser (1992).....	76
4.3.1.3 Enumeração de bolores e leveduras segundo Vanderzant & Splittstoesser (1992).....	76
4.3.1.4 Determinação do Número Mais Provável (NMP) de coliformes totais e fecais, segundo Vanderzant & Splittstoesser (1992).....	76
4.3.1.5 Enumeração de clostrídios sulfitos redutores.....	77
4.3.1.6 Enumeração de estafilococos produtores de coagulase, segundo Vanderzant & Splittstoesser (1992).....	77
4.3.1.7 Pesquisa de <i>Listeria monocytogenes</i> .....	78
4.3.1.8 Pesquisa de <i>Salmonella</i> sp.....	79

4.4 Produto intermediário e final.....	79
5 Resultados e Discussão.....	81
6 Referências Bibliográficas.....	93
<b>CAPÍTULO 6: Estimativa de riscos da contaminação de massa</b>	
<b>de pão de queijo com <i>Staphylococcus aureus</i>, <i>Salmonella Typhi</i></b>	
<b>e <i>Listeria monocytogenes</i>.....</b>	
	96
1 Resumo .....	97
2 Summary.....	98
3 Introdução.....	99
4 Material e Métodos.....	102
4.1 Tomada de amostras .....	102
4.2 Avaliação da qualidade microbiológica da massa	
escaldada, homogeneizada e não modelada .....	102
4.2.1 Preparo da amostra.....	103
4.2.2 Determinação do Número Mais Provável (NMP) de	
coliformes totais e fecais segundo Vanderzant & Splittstoesser (1992)...	103
4.2.3 Enumeração de estafilococos produtores e não produtores de	
coagulase, segundo Vanderzant & Splittstoesser (1992) .....	103
4.2.4 Enumeração de clostrídios sulfito redutores.....	105
4.2.5 Pesquisa de <i>Salmonella</i> sp.....	105
4.2.6 Pesquisa de <i>L. monocytogenes</i> .....	106
4.3 Inoculação experimental da massa escaldada, homogeneizada	
e não modelada com <i>S.aureus</i> produtor de “SEA”, Ref. FUNED .....	107
4.3.1 Contagem do microrganismo e confirmação de produção	
de enterotoxina por <i>S.aureus</i> produtor de “SEA”,	
Ref. FUNED, experimentalmente inoculado na massa escaldada,	
homogeneizada e não modelada .....	109
4.3.2 Verificação de produção e identificação de enterotoxina na	
massa escaldada, homogeneizada e não modelada experimentalmente	
inoculada com <i>S.aureus</i> produtor de “SEA”, Ref. FUNED .....	110

4.4 Inoculação experimental da massa escaldada, homogeneizada e não modelada com <i>S.typhi</i> , Ref. UNICAMP .....	110
4.4.1 Contagem de <i>Salmonella typhi</i> , Ref. UNICAMP, experimentalmente inoculada na massa escaldada, homogeneizada e não modelada.....	112
4.5 Inoculação experimental da massa escaldada, homogeneizada e não modelada com <i>L.monocytogenes</i> sorovar 1/2a, Ref. UNICAMP .....	113
4.5.1 Contagem de <i>L.monocytogenes</i> sorovar 1/2a, Ref. UNICAMP, experimentalmente inoculada na massa escaldada, homogeneizada e não modelada .....	114
5 Resultados e Discussão.....	116
6 Referências Bibliográficas .....	120
ANEXO A .....	123

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AB: Ágar Batata

APPCC: Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle

APT: Água Peptonada Tamponada

BC: Ágar de Mossel

“BHI”: “Brim Hearth Infusion”, caldo de infusão de cérebro e coração

“BP”: Baird Parker

BPF: Boas Práticas de Fabricação

CLD: Caldo Lactosado Duplo

CLS: Caldo Lactosado Simples

CVB: Caldo Verde Brilhante

EC: Caldo *E.coli*

“Elisa-SET-EIA”:

IgG: Imunoglobulina G

IMpq: Indústria Mineira de pão-de-queijo

“LEB”: “*Listeria* Enrichement Broth”

LST: Caldo lauril sulfato triptose

NMP: Número Mais Provável

“PCA”: “Plate Counter Ágar”, ágar padrão de contagem

PCCs: Pontos Críticos de Controle

“SE”: “Staphylococci Enterotoxins”

SPS: Ágar Sulfato de Polimixina-Sulfadiazina

SS: Ágar *Salmonella-Shigela*

TSA: Ágar Soja-Triptcaseína

VP: Caldo Voges Proskauer

UFC: Unidades Formadoras de Colônia

## **CAPÍTULO 1**

**Monitoramento de perigos e pontos críticos de controle e  
estimativa de riscos em uma Indústria Mineira de pão de queijo**

## 1 Resumo Geral

MACHADO, Elayne Cristina **Monitoramento de perigos e pontos críticos de controle e estimativa de riscos em uma Indústria Mineira de pão de queijo**. Lavras: UFLA, 2001. 130p. (Dissertação-Mestrado em Ciência dos Alimentos)<sup>1</sup>.

A aceitação do pão de queijo, além de seu consumo interno no Estado de Minas Gerais, ganhou o âmbito nacional, levando a indústria mineira, de maior e menor porte, a se interessar e buscar a qualidade do produto. A implantação de programas que visam a obtenção desta qualidade constitui instrumento eficiente e quase sempre pouco oneroso, destacando-se, em função de sua exequibilidade, o sistema APPCC, Análises de Perigos e Pontos Críticos de Controle, e ainda a microbiologia preditiva, através da qual se pode estimar riscos específicos de contaminação. Visando estes objetivos, foi pesquisada uma Indústria Mineira de pão de queijo, ora designada IMpq, que colocava diariamente 6t do produto congelado no mercado. Em uma primeira etapa, vistorias periódicas foram realizadas, tendo em vista as práticas de produção voltadas ao processamento e seu fluxo; condições de recepção, armazenagem e manejo da matéria-prima; uso de equipamentos e utensílios; situação de limpeza e sanificação e comportamento de manipuladores. Uma vez tomado conhecimento dos Pontos Críticos de Controle, PCC, análise microbiológica da superfície de equipamentos e utensílios; água tratada; matéria-prima; produto intermediário e produto final foram analisados. Examinou-se, ainda, o material clínico de manipuladores quanto à presença de estafilococos enterotoxigênicos. Excetuando-se a pesquisa com manipuladores, análises foram conduzidas, em uma primeira etapa, de acordo com as práticas adotadas pela IMpq, e em uma segunda, após implantação de medidas corretivas, caso estas se tornassem necessárias. Quanto à estimativa de riscos específicos, massa escaldada, homogeneizada e não congelada foi, de maneira individualizada, experimentalmente inoculada com  $10^4$ ,  $10^2$  e  $10^2$  UFC/g de *Staphylococcus aureus* produtor de "SEA"; *Salmonella Typhi* e *Listeria monocytogenes*, respectivamente. Uma vez inoculadas, as amostras de massa foram mantidas por 180 dias a  $-18^\circ\text{C}$ , conforme prazo e condições de vida-de-prateleira estabelecida para o pão de queijo. Os resultados evidenciados através das vistorias de inspeção confirmaram a necessidade de implantação de Boas Práticas de

---

<sup>1</sup>Comitê Orientador: Dr<sup>a</sup> Eliana Pinheiro de Carvalho – UFLA (Orientadora)  
Dr<sup>a</sup> Maria Lúcia Pereira – FUNED (Co-orientadora)



Fabricação, BPF. Matéria-prima, equipamentos e utensílios e área de produção foram responsabilizados pelo maior número de irregularidades. Cerca de 30,7% dos manipuladores mostraram-se portadores de estafilococos produtores de “SEA” e “SEB”. Fécula de mandioca, leite pasteurizado tipo C, soro liofilizado de leite pasteurizado e queijo parmesão apresentaram contagens condenatórias, sobretudo de *B.cereus*, coliformes fecais e estafilococos produtores de coagulase. Estes dois últimos grupos de microrganismos apresentaram populações elevadas no produto intermediário – massa homogeneizada e massa modelada – e ainda estiveram presentes na superfície de equipamentos, principalmente masseiras e máquina de ralagem de queijo. Após implantação das medidas corretivas voltadas às condições de estoque e manejo da matéria-prima; adequação de limpeza na área de produção; higiene e sanificação de equipamentos; postura dos manipuladores e acertos no processamento e seu fluxo, novo perfil microbiológico foi observado para todos os itens estudados. Este conjunto de medidas, em consonância com as BPF introduzidas e monitoradas na IMpq, permitiu a adequação da matéria-prima, produto intermediário e produto final, e ainda confirmou a vida-de-prateleira do produto, estimada em 180 dias a  $-18^{\circ}\text{C}$ . Mesmo em se considerando a realidade do tratamento térmico adicional ao qual se expõe o pão de queijo antes de seu consumo, a sobrevivência das linhagens patogênicas testadas e, mais ainda, a confirmação de produção de “SEA” diretamente na massa do pão de queijo servem de alerta para o risco de contaminação cruzada, quer seja na própria indústria, restaurantes e similares ou mesmo no ambiente doméstico.

## 2 General Summary

**MACHADO, Elayne Cristina Dangers an control critical points monitoring an risk estimate in a cheese-roll industry of Minas Gerais. Lavras: UFLA, 2001. 130p. (Dissertation - Master in Food Science)<sup>2</sup>.**

The national popularity of the cheese-roll beyond its internal consumption in the state of Minas Gerais has led both larger and smaller state industries to seek improvement in the quality of the product. The implementation of programs with a view to attaining this quality is an efficient and inexpensive means to that end, with the HACCP system, Hazard Analysis Critical Control Points, an outstanding example in virtue of its feasibility. To achieve these aims, a cheese-roll industry of Minas Gerais was studied, herein designated IMPq, produced and put on the daily market 6 t of the frozen product. At a first stage, periodical inspections were made, keeping in mind production practices regarding processing and its flow; reception conditions, storage and handling of raw materials; use of equipment and implements; cleaning, sanitation, and building situation of the industry, and behavior of the food-handlers. Once the Critical Control Points (CCP) were known, a microbiological analysis was made of the equipment and implement surfaces, treated water, raw material, intermediate and final product. Clinical material of the handlers, with respect to the presence of enterotoxigenic staphylococci, was also examined. With the exception of the research on the handlers, analyses were made, at a first stage, according to the practices adopted by the IMPq, and, at a second stage, after corrective measures were implanted if these proved necessary. As for the estimate of specific risks, scalded, homogenized and non-frozen dough was, individually, experimentally inoculated with  $10$ ,  $10^2$ , and  $10^2$ UFC/g of "SEA" producing *Staphylococcus aureus*, *Salmonella Typhi*, and *Listeria monocytogenes*, respectively. Once inoculated, the dough samples were maintained for 180 days at  $-18^\circ$ , in accordance with the time limit and shelf life conditions established for cheese-rolls. The given results, through the periodical inspections, confirmed the need for implanting Good Manufacturing Practices, GMP. Raw material, equipment and implements, and the production area were responsible for the greatest number of irregularities. About 30.7% of the

---

<sup>2</sup>Guidance Committee: Dr<sup>a</sup> Eliana Pinheiro de Carvalho - UFLA (Major Professor)  
Dr<sup>a</sup> Maria Lúcia Pereira - FUNED (Co-Professor)

handlers proved to be bearers of “SEA” and “SEB” producing staphylococci. Manioc flour, grade C pasteurized milk, liphyllous whey of pasteurized milk, and parmesan cheese displayed unsatisfactory counts, especially of *B. cereus*, fecal coliforms, and coagulase producing staphylococci. These two latter groups of microorganisms showed high populations in the intermediate product—homogenized and molded dough—and were even present in the equipment surfaces, mainly the kneaders and cheese-grating machine. After implanting the corrective measures regarding storage conditions and handling of raw material, proper cleaning in the production area, hygiene and sanitation of equipment, behavior of handlers, and adjustments in processing and its flow, a new microbiological profile was observed for all the items studied. This set of measures, together with GMP, introduced and monitored at the IMpq, allowed for satisfactory raw materials, and intermediate and final product, as well as confirming the shelf life of the product, estimated at 180 days at  $-18^{\circ}\text{C}$ . Even if the reality of the additional thermic treatment is considered, to which the cheese-roll is exposed before consumption, the survival of the pathogens tested serves as a warning of the risk of cross-contamination, in the industry itself, restaurants and similar establishments, or even in the domestic environment.

### 3 Introdução Geral

Dentre os produtos alimentícios elaborados a partir de queijo, o pão de queijo se destaca como aquele de maior aceitação popular. Desde muito, caracteriza um hábito alimentar e, mais ainda agora, havendo sido o queijo aqui produzido tombado como patrimônio, tornou-se o pão de queijo signo emblemático sócio cultural e econômico do Estado de Minas Gerais.

Com o advento da cadeia de frios, foi viabilizada a colocação no mercado, não apenas local, mas, de maneira mais abrangente, em todo país, do pão de queijo congelado, passando a existir, a partir daí, a premência do estabelecimento de perfil ou padrão do alimento em questão, e, conseqüentemente, a busca de controle e garantia de sua qualidade.

A formulação do pão-de-queijo, até então de forma empírica, repassada, portanto, de mão-a-mão no contingente mais íntimo da cozinha mineira, passou a caracterizar uma idéia rentável, e, em se tratando de produto genuinamente mineiro, foi, também aqui, que se estabeleceram as suas primeiras indústrias.

O pão de queijo apresenta, em sua formulação básica, polvilho azedo ou doce, fécula de mandioca, queijo de “meia cura”, leite, sal, ovos e óleo.

No que concerne à escala industrial, a massa é, por etapas, elaborada a partir do escaldamento das farinhas com mistura fervente de água, óleo e sal. A este escaldo é adicionado leite e queijo ralado para, após, adequada homogeneização de seus constituintes, ser modelada sob a formas de bolas, as quais, uma vez congeladas, são acondicionadas em embalagens plásticas e, usualmente, postas no mercado consumidor em pacotes de 500g.

Poder-se-ia dizer que Minas Gerais comporta número crescente de indústrias no gênero, todavia, Belo Horizonte retém aquelas marcas mais expressivas em termos de volume de produção.

Estas indústrias, em sua grande maioria, já dispõem de equipamentos de grande porte. Betoneiras, masseiras, máquinas de ralagem de queijo, modeladoras e empacotadoras foram introduzidas em decorrência da escala de produção que o produto em questão atingiu, sobretudo a partir da década de 90.

Sob o aspecto microbiológico, o pão de queijo está susceptível a diferentes fontes de contaminação, podendo-se destacar, entre os patógenos, *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella* sp. e mesmo *Listeria monocytogenes*, conforme proveniência mais provável do polvilho, leite, queijo e ovo.

Somando-se a estes fatores, a busca de bactérias indicadoras de higiene e sanidade pode espelhar o processamento e seu fluxo; condições de recepção, armazenagem e manipulação da matéria-prima; condições de equipamentos e utensílios; situação de limpeza e sanificação da indústria e, ainda, manipuladores envolvidos na linha de produção. Dentre estas bactérias, podem ser citadas os coliformes totais, coliformes fecais, bactérias aeróbias mesófilas, estafilococos produtores ou não de coagulase e clostrídios sulfitos redutores.

Até o presente momento, não existem dados da literatura que incriminem o pão de queijo em processos de intoxicação alimentar. Isto pode ser justificado pelo fato de o alimento ser submetido, antes do consumo, a tratamento térmico adicional. Todavia, em função da presença em sua formulação de ingredientes de origem animal, queijo, leite e ovo, existe uma possibilidade real de transferência microbiana de um alimento a outro por contaminação cruzada.

Com base no acima exposto, o presente trabalho, de forma bastante elaborada e pormenorizada, teve como premissa a Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle, APPCC, que se realizou em uma Indústria Mineira de pão de queijo, então designada IMPq.

Este programa visa o controle dinâmico de qualidade, isto é, aquele que, distintamente, não se atém com exclusividade ao produto acabado.

Somando-se ao sistema APPCC, realizou-se, ainda, um estudo de microbiologia preditiva, através da qual foi modelado um experimento de inoculação experimental do produto intermediário, mantido durante 180 dias a  $-18^{\circ}\text{C}$ , com as linhagens teste *S.aureus* produtor de "SEA", *S.Typhi* e *L.monocytogenes*.

Pela modelagem experimental, baseada na confirmação ou não de crescimento e produção de enterotoxinas das linhagens testes, tentou-se prever ou estimar os riscos a que pode estar exposto o consumidor.

Assim, o objetivo geral deste trabalho consistiu no diagnóstico e controle dos possíveis Pontos Críticos, PCs; seguido, caso fosse necessário, da implantação e ou correção das Boas Práticas de Fabricação, BPF, através de vistorias e análises microbiológicas de inspeção de uma Impq.

Em paralelo, análises microbiológicas foram realizadas tendo em vista:

- Controle da área de produção e da higienização dos equipamentos, masseiras, betoneiras, máquina de ralagem do queijo, modeladora e empacotadora;
- Controle de manipuladores quanto à presença de estafilococos enterotoxigênicos;
- Confirmação de potabilidade da água usada industrialmente;
- Avaliação da qualidade da matéria-prima – polvilho e fécula de mandioca, leite pasteurizado tipo C, soro liofilizado de leite pasteurizado, queijo parmesão e ovo líquido pasteurizado;

- **Avaliação da qualidade do produto intermediário - massa de pão de queijo, nas fases de escaldo, homogeneização, modelagem e congelamento;**
- **Avaliação da qualidade do produto acabado; e**
- **Avaliação da vida-de-prateleira do produto, estabelecida em 180 dias a  $-18^{\circ}$  C.**

## **4 Referencial Teórico**

### **4.1 O pão de queijo**

A origem do pão de queijo não é bem certa; há suspeitas de que esta tenha ocorrido nas regiões de grande produção leiteira e de mandioca do Estado de Minas Gerais. Nos antigos casarões, os escravos faziam o biscoito de polvilho, cuja formulação era desprovida de queijo; entretanto, acha-se que, acrescentando-o a esta quitanda, e após algumas modificações, chegou-se até a formulação do pão de queijo.

Ainda nas casas mineiras, existem quitadeiras ou mesmo donas de casa que costumam elas próprias produzirem a massa do pão de queijo, e foi assim, a partir de uma receita doméstica e de uma produção excessiva, que se iniciou a comercialização do produto.

As indústrias de pão-de-queijo, em sua grande maioria mineiras, estão empenhadas em divulgar o produto genuinamente mineiro. Tendo estas indústrias grande êxito na comercialização deste produto no Brasil como um todo, viram-se diante de um grande desafio, ganhar o mercado internacional. Para isso, algumas empresas já se preparam, desenvolvendo embalagens mais resistentes e se adequando às exigências do mercado.

O pão de queijo, hoje em dia, vem sendo consumido de várias formas: na mesa do café da manhã, nos lanches rápidos dos estudantes, no acompanhamento às refeições, em festas requintadas ou em reuniões informais como salgadinhos acompanhados de recheios ou patês. Este produto de confeitaria vem há muito substituindo o tradicional pão francês, uma vez que o acesso ao pão de queijo está ficando cada vez mais fácil.

Este produto apresenta, em sua formulação básica, polvilho azedo ou doce, fécula de mandioca, queijo de “meia cura”, leite, sal, ovos e óleo. Existem



diferenças entre as formulações; estas diferenças estão na escolha de algumas matérias-primas no processamento e até mesmo no modo de assar.

A produção do pão-de-queijo, nas indústrias, envolve as etapas de recepção e pesagem das matérias-primas, escaldamento, mistura, corte, congelamento, embalagem e armazenamento.

#### **4.2 Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle (APPCC)**

A abordagem sistemática sobre a segurança do alimento foi inicialmente desenvolvida por empresas produtoras de alimento, em conjunto com o programa aeroespacial dos Estados Unidos, para garantir que os alimentos preparados para os astronautas fossem seguros sob o ponto de vista sanitário (Bryan *et al.* 1993).

Após vários ensaios, foi adaptado o conceito “Modos de falha” que havia sido desenvolvido pelos Laboratórios Nacionais do Exército dos Estados Unidos da América. Esse conceito baseia-se no conhecimento e experiências relativos à produção e/ou processamento do alimento, através dos quais se poderiam descobrir falhas e como estas comprometeriam a inocuidade dos alimentos. Com base neste tipo de análises, estas falhas, identificadas ao longo do processo de produção, tornaram-se conhecidas como Pontos Críticos de Controle (PCC). O sistema de Análises de Perigos e Pontos Críticos de Controle, APPCC, foi desenvolvido para ser aplicado desde à matéria-prima até o processamento como um todo, para prevenir a ocorrência de perigos e, assim, poder garantir a inocuidade dos alimentos.

A natureza preventiva deste sistema era, inicialmente, a de identificar qualquer problema relacionado com a inocuidade dos alimentos, e que, estivesse vinculado à cadeia produtiva dos mesmos. Em seguida, seriam determinados os fatores específicos que precisavam ser controlados para evitar os problemas, antes que eles ocorressem, e para isso deveriam ser estabelecidos sistemas que

pudessem medir e documentar se esses fatores estavam sendo controlados adequadamente.

Estas recomendações motivaram a formação de um comitê composto principalmente de microbiologistas de alimentos, que se reuniram pela primeira vez em 1988, designado Comitê Nacional de Assessoria em Critérios Microbiológicos para Alimentos (National Advisory Committee on Microbiological Criteria for Foods, NACMCF).

Em 1989, foi publicado o primeiro documento traçado pelo grupo de estudos do APPCC pela NACMCF, intitulado “Princípios APPCC para a Produção de Alimentos”, por meio do qual se definiu o APPCC como sendo “um enfoque sistemático para ser usado na produção de alimentos, como forma de garantir sua inocuidade”.

Após sucessivos estudos e diferentes interpretações do primeiro documento, o NACMCF, em 1991, reconvocou o grupo de trabalho APPCC para revisar o relatório de 1989. A partir daí, estabeleceram-se sete princípios para o sistema APPCC: efetuar uma análise de perigos e identificar as medidas preventivas respectivas; identificar os pontos críticos de controle (PCCs); estabelecer limites críticos para as medidas preventivas associadas com cada PCC; estabelecer os requisitos de controle (monitoramento) dos PCCs; estabelecer ações corretivas para o caso de desvio dos limites críticos; estabelecer um sistema para registro de todos os controles; e estabelecer procedimentos de verificação para averiguar se o sistema está funcionando adequadamente.

### 4.3 Principais agentes patogênicos enfocados na pesquisa

#### 4.3.1 *Listeria monocytogenes*

De acordo com o Bergey's Manual of systematic Bacteriology (Holt, 1994), o gênero *Listeria* está incluído junto às bactérias coriniformes, entretanto a utilização de metodologias de sistemáticas moleculares mostrou que a bactéria é filogeneticamente diferenciada em dois grupos, um formado por *L.grayi* e *L.murrayi*, e outro, por *L.monocytogenes*, *L.ivanovii*, *L.innocua*, *L.welshimeri* e *L.seeligeri*.

A maioria das *Listerias* são saprófitas, porém algumas são patógenas para o homem e diversos animais; a *L.monocytogenes* está entre as causadoras de patologia ao homem, enquanto a *L.ivanovii* é patogênica apenas para os animais.

*L.monocytogenes* possui ampla distribuição na natureza, tendo sido isolada de várias fontes, como solo, silagens, grama, hortaliças, leite de vaca, vegetais em decomposição, material fecal, água de esgoto, animais domésticos, peixes e crustáceos (Hofer, 1975 a,b; Barnes, 1989; Moura *et al.* 1993; Lage, 1993; Destro *et al.* 1996; Silva, 1999).

*L.monocytogenes* apresenta-se na forma de bastonetes regulares de 0,4 a 0,5µm de diâmetro e 0,5 a 0,2µm de largura, gram-positivas, é não formadora de esporos e não encapsulada, aeróbia e anaeróbia facultativa. São móveis, apresentando flagelos peritríquios, quando cultivadas a 20-25°C. Formam colônias de 0,5 a 1,5mm em ágar nutritivo, arredondas, translúcidas, convexas e com bordas regulares.

Quanto à bioquímica, *L.monocytogenes* apresenta reação positiva para o teste de Voges-Proskaver, são catalase-positivas e oxidase-negativas. Não hidrolisam uréia, gelatina e caseína e não são produtores de indol e H<sub>2</sub>S.

O primeiro caso confirmado de listeriose envolvendo o homem ocorreu na Dinamarca, foi relatado por Nyfeldt, 1929, porém em 1921 já haviam sido cultivadas linhagens semelhantes, procedentes de um caso de meningite humana, nos laboratórios do Instituto Pasteur (Pereira *et al.* 2001).

A listeriose humana apresenta conseqüências mais graves quando atinge crianças, mulheres grávidas, pessoas idosas e também indivíduos imunodeprimidos (Lovett, 1988). A doença manifesta-se usualmente como aborto septcêmico, septicemia do recém-nascido e do adulto, meningite e meningocefalia, entre outras formas de manifestação (Marth, 1988).

Apesar de a *L.monocytogenes* ser um patógeno estudado por mais de 60 anos, somente a partir da década de 80 é que foi reconhecida sua importância em saúde pública, associada a toxinfecções alimentares humanas.

A característica ubiqüitaria e de resistência fisiológica do microrganismo e a gravidade do processo patológico provocado no homem, aliadas à crescente utilização da cadeia de frios, para manutenção de produtos alimentícios prontos para consumo, sem dúvida explicam o lugar de destaque que *L.monocytogenes* vem ocupando no controle de qualidade da indústria de alimentos e organismos de saúde (Pereira *et al.* 2001).

Esta bactéria pode se desenvolver em temperaturas de refrigeração, podendo proliferar em alimentos mantidos nessa condição. A maioria dos surtos envolvendo *L.monocytogenes* ocorreram devido à ingestão de alimentos refrigerados, particularmente derivados do leite, sobremesas e vegetais (Farber *et al.* 1991).

O estudo deste patógeno no presente trabalho baseia-se no fato de que, para a formulação do pão de queijo, utiliza-se leite e queijo, principais alimentos de propagação da *L.monocytogenes*, e também pelo fato de este produto ser mantido em baixas condições de temperatura, sendo esta favorável para o crescimento deste patógeno.

#### 4.3.2 *Salmonella* sp

*Salmonella* constitui um gênero da família *Enterobacteriaceae* (Brunner *et al.* 1983). Os representantes desta família se caracterizam por bactérias gram-negativas, anaeróbias facultativas, esporogênicas, em forma de bacilo. Produzem ácido e, às vezes, gás. Na presença de glicose, são catalase-positivas e oxidase-negativas e ainda reduzem nitratos a nitritos.

A origem da maioria das infecções ocorre através da ingestão de água, alimentos contaminados ou disseminação fecal-oral direta em crianças. As fontes mais comuns de infecção humana são aves domésticas, ovos e laticínios.

Os ovos podem contaminar-se por salmonelas pela via transovárica nas poedoras infectadas ou como consequência da penetração do microrganismo pela casca e membranas, especialmente quando este é resfriado ou lavado inadequadamente. Já a superfície da casca dos ovos pode se contaminar durante o trânsito na cloaca ou quando exposto a um ambiente contaminado com material fecal (Humphrey, 1994; International Commission on Microbiological Specifications for Foods, 1996).

Os produtos derivados do ovo, tanto os desidratados como os congelados que não tenham sido pasteurizados, são evidentes veículos de salmonelas.

No leite, as salmonelas chegam por meio de contaminação do úbere e dos mamilos, e ainda, em menor concentração, durante infecções sépticas das vacas e, possivelmente, dos operários que manipulam o leite. Os produtos lácteos (por ex., o leite em pó, o queijo, manteiga, etc) também têm sido identificados como veiculadores de salmonelas (Bryan *et al.* 1986).

Embora a exposição a *Salmonella* seja freqüente, é necessário um grande inóculo ( $10^{6-8}$  UFC/g de bactérias) para o desenvolvimento de doença sintomática. A doença ocorre quando o organismo tem oportunidade de se multiplicar, alcançando elevada densidade, como em alimentos refrigerados

conservados inadequadamente, em indivíduos que possuam maior risco de doença devido à idade, imunossupressão ou doença subjacente (leucemia, linfoma, anemia falciforme), ou redução da acidez gástrica, que efetivamente aumenta a dose infecciosa (Doyle, 1989).

As infecções por *Salmonella* ocorrem em uma das quatro formas: gastroenterite, bacteremia, febre entérica e colonização assintomática.

A gastroenterite é a forma mais comum de salmonelose. Em geral, os sintomas surgem de 6 a 48 horas após o consumo de alimento ou água contaminados, com apresentação inicial de náuseas, vômitos e diarreia não-sanguinolenta. A elevação da temperatura, cólica abdominal, mialgias e cefaléia também são comuns. Os sintomas podem persistir de dois a sete dias antes da resolução espontânea.

Todas as cepas de *Salmonella* podem causar bacteremia, apresentando, dentre outras, infecções supurativas localizadas, como osteomielite, endocardite ou artrite.

A *S. Typhi* e a *S. Paratyphi* produzem uma doença febril denominada febre tifóide ou febre paratifóide, respectivamente. A apresentação clínica de ambas as doenças é semelhante, embora a febre paratifóide geralmente seja mais leve. Após um período de incubação de 10 a 14 dias depois da ingestão de bacilos, o paciente apresentará, gradualmente, febre termitente crescente com queixas inespecíficas de cefaléia, mialgias, mal-estar e anorexia. Estes sintomas persistem por uma ou mais semanas e são seguidos por sintomas gastrointestinais. Este ciclo corresponde a uma fase de bacteremia inicial seguida por infecção dos intestinos (Doyle, 1989).

O que justifica a pesquisa da presença de *Salmonella* no pão de queijo, é o fato deste, possuir como matéria-prima, alimentos de origem animal, tais como leite, queijo e principalmente ovos.

### 4.3.3 *Staphylococcus aureus*

Inicialmente, os estafilococos foram observados por Koch, em 1878, a partir de material purulento, e em 1880, a partir de cultivados em meios líquidos por Pasteur. A primeira publicação destes microrganismos, em forma de “cocos”, e sua constância em abscessos agudos e crônicos, tiveram lugar na Escócia, nos idos de 1881. Foi também a partir destes estudos que passaram a receber a denominação de *Staphylococcus* devido ao fato de que, quando observados microscopicamente, apresentavam-se sob a forma de grãos arranjados ou dispostos como cachos de uvas (Ogston apud Baird-Parder, 1990).

Estafilococos (gr. *Staphyle*, uva) apresentam-se como cocos gram-positivos, imóveis agrupados em massas irregulares ou em cachos de uva. Pertencem à família *Micrococcaceae* e ao gênero *Staphylococcus*. São aeróbios ou anaeróbios facultativos e produtores de catalase. Fermentam a glicose com produção de ácido, tanto em aerobiose como em anaerobiose, diferenciando-se, assim, dos microrganismos do gênero *Micrococcus*, que só a fermentam em aerobiose (Kloos & Schleifer, 1986).

Quanto à atividade de água ( $a_w$ ), o crescimento de *S.aureus* está na faixa de 0,83-0,99, de acordo com Tatini, 1973, citado por Pereira 1996, que relatou também que este microrganismo é capaz de crescer em altas concentrações de cloreto de sódio.

Muitos alimentos foram epidemiologicamente incriminados e são freqüentemente relatados como capazes de tolerar o desenvolvimento natural e artificial do *S.aureus*, bem como a produção de suas enterotoxinas. Dentre os principais substratos alimentícios, de acordo com estudos científicos, podem ser citados produtos lácteos (queijos, leite cru, pasteurizado e em pó, manteiga e sorvetes), produtos de confeitaria (tortas, bolos recheados e doces cremosos), carnes frescas e curadas; ovos e massas alimentícias (Pereira, 1996).

A intoxicação estafilocócica é uma doença comum entre surtos alimentares, que ocorre devido à ingestão de alimentos contaminados por enterotoxinas produzidas por algumas espécies de *Staphylococcus* (Bergdoll, 1989) e tem proporcionado ampla divulgação científica (Pereira, 1996).

As enterotoxinas estafilocócicas pertencem a um grupo de nove exoproteínas sorologicamente distintas e são classificadas como EEA, EEB, EEC<sub>1</sub>, EEC<sub>2</sub>, EEC<sub>3</sub>, EED, EEE, EEG, EEH, EEI e EEJ. A EEA predomina nos surtos de intoxicação alimentar e cerca de 5% das intoxicações são causadas por enterotoxinas ainda não identificadas (Balaban et al. 2000).

Os sintomas clínicos mais frequentes são vômito e diarreia, que ocorrem de 2 a 6 horas após a ingestão do alimento contaminado.

A primeira observação registrada que associou os estafilococos à intoxicação alimentar provavelmente foi feita, em 1884, por Vaughan & Sterneberg, contido em Dack, 1956. Os autores demonstraram uma intoxicação ocorrida em Michigan, envolvendo pessoas que haviam se alimentado de queijo contaminado por estafilococos.

Até o momento, não existem dados na literatura que incriminem o pão de queijo em processos de intoxicação alimentar, principalmente causada por enterotoxina estafilocócica, mas, levando-se em conta sua formulação básica (queijo e leite), pode-se supor uma contaminação cruzada do produto em questão. Além disso, para a produção de pão de queijo é necessária excessiva manipulação da matéria-prima, o que aumenta o risco de contaminação do produto pelos manipuladores, pois dados da literatura demonstram que os estafilococos, dentre os microrganismos gram-positivos, fazem parte da microbiota humana, principalmente da cavidade orofaríngea, fossas nasais e leito sub-unguial (Munch-Petersen, 1961; Willians, 1963; Malaki *et al.* 1973; Cardoso *et al.* 1988; Raddi *et al.* 1988).



Sendo assim, o portador de estafilococos enterotoxigênicos, enquanto manipulador de alimentos, representa indiscutível elo na cadeia epidemiológica da intoxicação alimentar (Bryan, 1978; Bryan, 1980; Iaria *et al.* 1980; Bergdoll, 1989; Cruickshand, 1990; Tranter, 1990).

## 5 Referências bibliográficas

ALMEIDA, C.R. O sistema HACCP como instrumento para garantir a inocuidade dos alimentos. *Higiene Alimentar*, São Paulo, v.12, n.53, p.12-29, jan/fev. 1998.

BARNES, R. et al. Listeriosis associated with consumption of turkey franks. *Morbidity And Mortality Weekly Report*, Atlanta, v.38, n.15, p.267-8, 1989.

BERGDOLL, M. S. *Staphylococcus aureus*. In: Doyle, M.P. (ed). *Foodborne bacterial pathogens*. New York: Marcel Bekker, 1989. p.463-523.

BRUNNER, F.; MARGADENT, A.; PEDUZZI, R.; PIFFARETTI, J.C. The Plasmid as an Epidemiologia Tool for Salmonella-Typhimurium Epidermies Comparison With The Lysotype. *Journal of Infections Diseases*, Chicago, v.148, p.7-11, 1983.

BRYAN, F.L. Factors that contribute to outbreaks of foodborne disease. *Journal of Food Protection*, Ames, v.41, n.12, p.816-27, Dec. 1978.

BRYAN, F. L. Foodborne disases in the United States associated with meat and poultry. *Journal of Food Protection*, Ames, v.43, n.2, p.140-150, Feb. 1980.

BRYAN, F.L. Aplicação do método de análise de risco por pontos críticos de controle, em cozinhas industriais. *Higiene Alimentar*, São Paulo, v.7, n.25, p.15-25, ago/set. 1993.

BRYAN, J.P.; ROCHA, H.; SCHELD, W.M. Problems in Salmonelloris-Rationale for Clinical Trials with newer Betalactans Agents and Huinolones. *Reviews of Infection Diseases*, Chicago, v.8, n.2, p.189-207, Mar. 1986.

CARDOSO, C.L.; TEIXEIRA, L.M.; GONTIJO FILHO, P.P. Antimicrobial susceptibilities and phage typing of hospital and non-hospital strains of methicilin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Revista de Microbiologia*, São Paulo, v.19, n.4, p.385-92, out/dez. 1988

CRUICKSHANK, J.G. Food handlers and food poisoning. Training programmes are the best. *British Medical Journal*, London, v.300, n.6719, p.207-208, Jan. 1990.

DACK, G. M. **Food Poisoning**. Chicago: University Chicago Press, 1956.

DESTRO, M.T.; LEITÃO, M.F.F.; FARBER, J.M. Use of molecular typing methods to trace the dissemination of *Listeria monocytogenes* in a shrimp processing plant. **Applied of Environment Microbiology**, Washington, v.62, n.2, p.705-11, Feb. 1996.

DOYLE, M.P. (ed). **Foodborne bacterial pathogens**. New York: Marcel Bekker, 1989. p.463-523.

FARBER, J.M.; PETERKIN, P.I. *Listeria monocytogenes* a foodborne pathogen. **Microbiological Review**, Washington, v.55, n.4, p.476-511, Dec. 1991.

HOFER, E. Isolamento e caracterização de *Listeria monocytogenes* em águas de esgoto. **Memorial do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v.73, n.1/2, p.31-8, Dec. 1975a.

HOFER, E. Study on *Listeria* spp. on vegetable for human consumption. In: **Congresso Brasileiro de Microbiologia**, v.6, Salvador, 1975b.

HOLT, J. G., KRIEG, N. R, SNEATH, P. H. A. et al. **Bergey's Manual of Determinative Bacteriology** 9 ed. Baltimore: Willians & Wilkins, Baltimore, 1994. 787 p.

HUMPHREY, T.J. Contamination of egg Shell and contents with *Salmonella* Enteritidis: a review. **International Journal Food Microbiology**, Amsterdam, v.21, n.1/2, p.31-40, Jan. 1994.

IARIA, S.T.; FURLANETO, S.M.P.; CAMPOS, M.L.C. Pesquisa de *Staphylococcus aureus* enterotoxigenico nas fossas nasais de manipuladores de alimentos em hospitais, São Paulo. **Revista de Saúde Pública**, São Paulo, v.14, p.93-100, jan/mar. 1980.

ICMSF. INTERNATIONAL COMISSION ON MICROBIOLOGICAL SPECIFICATIONS FOR FOODS. **Microbiologia de los alimentos: Características de los patógenos microbianos**, 1996.

KLOOS, W.E.; SCHLEIFER, K.H. Genus IV. *Staphylococcus* Rosenbach 1884, 18AL, (Nom. cons. Opin. 17 Jud. comm. 1958, 153). In: SNEATH, P.H.A.; MAIR, N.S.; HOLT, J.G. (Ed.). **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology**, Baltimore: Williams & Williams, 1986. v. 2.

LAGE, M.E. **Ocorrência de *Listeria* spp. em carne de frango no mercado da cidade de Belo Horizonte, MG.** 1993. 85p. Dissertação (Mestrado em microbiologia)– Escola de Veterinária – Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

LOVETT, J. Isolation and identification of *Listeria monocytogenes* in dairy foods. **Journal of the Association Official Analytical Chemistry**, Cincinnati, v.71, n. 3, p.658-660, May/June 1988.

MALAKI, M.; KOHNEHSHAHRI, M.; GHARAGOZLOO, R. Bacteriophage typing of staphylococci isolated from foodstuffs and food handlers in Tehran. **Journal of Milk Food Technology**, Des Moines, v.36, n.5, p.262-71, 1973.

MARTH, E.H. Disease characteristics of *Listeria monocytogenes*. **Food Technology**, Chicago, v.42, n.4, p.165-168, Apr. 1988

MOURA, S.M.; DESTRO, M.T.; FRANCO, B.D.G.M. Incidence of *Listeria* species in raw and pasteurized milk produced in São Paulo, Brazil. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v.19, n.3, p.229-237, Aug. 1993.

MUNCH-PETERSEN, E. Staphylococcal carriage in man. An attempt at a quantitative survey. **Bulletin De Organisatio Mondiale de La Sante**, Geneva, v.24, p.761-769, 1961.

NYFELDT, A. Etiologie de la mononucleose infectieuse. **Comptes Rendus Des Seances De La Societe De Biologie**, Paris, v.101, p.590-591, 1929

OGSTON, A. Report upon microorganisms in surgical diseases. **Brit. Med. J.**, v.1, p.369-75, 1981. Apud: BAIRD-PARKER, A.C. The staphylococci – an introduction. **Journal Applied Bacteriology**, Oxford, 1990. v. 68.

PEREIRA et al. Recovery of *Listeria monocytogenes* in minas-type cheese stored at low temperature. **Ciencia e Tecnologia dos Alimentos**, Campinas, 2001 (submetido)

PEREIRA, M. L. **Estafilococos coagulase negativos pauciprodutores de enterotoxinas e relato de um surto por espécie coagulase positiva.** 1996. 143p. Tese (Doutorado em Ciência dos Alimentos) – Universidade Estadual de Campinas, Campinas.

RADDI, M.S.G.; LEITE, C.Q.F.; MENDONÇA, C.P. *Staphylococcus aureus* portadores entre manipuladores de alimentos. **Revista de Saúde Pública**, São Paulo, v.22, n.1, p.36-40, jan/mar. 1988.

SILVA, J.A. As novas perspectivas para o controle sanitário dos alimentos. **Higiene Alimentar**, São Paulo, v.12, n.65, p.19-25, out. 1999.

TRANter, H.S. Foodborne staphylococcal illness. **Lancet**, London, v.336, n.8722, p.1044-1046, Oct. 1990.

WILLIAMS, R.E.O. Healthy carriage of *Staphylococcus aureus*; its prevalence and importance. **Bacteriological Reviews**, Baltimore, v.27, n.1, p.56-71, 1963.

## **CAPÍTULO 2**

### **Identificação de perigos e pontos críticos de controle e avaliação das práticas de fabricação em uma Indústria Mineira de pão de queijo**

## 1 Resumo

**MACHADO, Elayne Cristina Identificação de perigos e pontos críticos de controle e avaliação das práticas de fabricação em uma Indústria Mineira de pão de queijo.** Lavras: UFLA, 2001. 130p. (Dissertação - Mestrado em Ciência dos Alimentos)<sup>1</sup>.

A aceitação do pão de queijo, além de seu consumo interno no Estado de Minas Gerais, ganhou o âmbito nacional, levando a indústria mineira, de maior e menor porte, a se interessar e buscar a qualidade do produto. A implantação de programas que visam a obtenção desta qualidade constitui instrumento eficiente e, quase sempre, pouco oneroso, destacando-se, em função de sua exequibilidade, o sistema APPCC. Com vistas a estes objetivos, foi estudada uma Indústria Mineira de pão de queijo, então designada IMpq, que produzia e colocava diariamente 6t do produto congelado no mercado. Com auxílio de um Questionário de Inspeção, especialmente modificado para este fim, vistorias periódicas foram realizadas. Processamento e seu fluxo; condições de recepção, armazenagem e manipulação da matéria-prima; uso de equipamentos e utensílios; situação de limpeza, sanificação e edificação da indústria e comportamento de manipuladores envolvidos na linha de produção foram enfocados. Estes itens, desdobrados em 53 subitens, foram pesquisados, de maneira equânime, e a eles foram atribuídos valores mínimo e máximo de 0 a 60 pontos, para posterior conceituação de A a D, ótimas a péssimas condições de funcionamento, respectivamente. Os dados gerados através de criteriosa observação e da análise de informações emitidas por 13 manipuladores evidenciaram a matéria-prima, equipamentos e utensílios e área de produção como aqueles responsáveis pelo maior número de irregularidades. No cômputo geral, foi conferida à indústria em questão pontuação 33 e conceito C, ficando constatada a necessidade da implantação de Boas Práticas de Fabricação, BPF.

Palavras-chaves: APPCC, BPF, pão de queijo

---

<sup>1</sup>Comitê Orientador: Dr<sup>a</sup> Eliana Pinheiro de Carvalho – UFLA (Orientadora)  
Dr<sup>a</sup> Maria Lucia Pereira – FUNED (Co-orientadora)

## 2 Summary

**MACHADO, Elayne Cristina Identification of dangers and critical controls points and evaluation of the manufacturing process in a cheese-roll Industry of Minas Gerais. Lavras: UFLA, 2001. 130p. (Dissertation - Master in Food Science)<sup>2</sup>.**

The national popularity of the cheese-roll beyond its internal consumption in the state of Minas Gerais has led both larger and smaller state industries to seek improvement in the quality of the product. The implementation of programs with a view to attaining this quality is an efficient and inexpensive means to that end, with the HACCP system, an outstanding example in virtue of its feasibility. To obtain these aims, a cheese-roll industry of Minas Gerais was studied, produced and put on the daily market 6 t of the frozen product. With the aid of an Inspection Questionnaire, specially modified for this purpose, periodical inspections were carried out. Processing and its flow; reception conditions, storage and handling of raw materials; use of equipment and implements; cleaning, sanitation, and building situation of the industry, and behavior of the handlers involved in the production line were all analyzed. These items, broken down into 53 sub-items, were researched, in an even-handed way, and maximum and minimum numerical values were assigned, from 0 to 60 points, with a subsequent grading from A to D, excellent to poor work conditions, respectively. From the data produced through the careful observation and analysis of the information given by 13 handlers, the raw material, the equipment and implements, and the production area were responsible for the greatest number of irregularities. In the general estimate, 33 points and a grade of C were given the industry in question, with the proven need to implement good manufacturing practices.

**Key-words:** HACCP, GMP, cheese-roll

---

<sup>2</sup>Guidance Committee: Dr<sup>a</sup> Eliana Pinheiro de Carvalho - UFLA (Major Professor)  
Dr<sup>a</sup> Maria Lúcia Pereira – FUNED (Co-Professor)



### **3 Introdução**

A preocupação com a qualidade de produtos alimentícios tem levado produtores à busca de sistemas e programas que visam a obtenção de alimentos dentro dos padrões de qualidade e segurança estabelecidos por lei.

O sistema mais largamente difundido e aceito denomina-se APPCC, tendo como principais objetivos a identificação de perigos específicos e o estabelecimento de medidas preventivas de controle, a fim de assegurar a qualidade e inocuidade dos alimentos.

O sistema APPCC, com implantação regulamentada desde 1993, através da Portaria nº 1428 do Ministério da Saúde (Brasil, 1993), prevê, entre outros aspectos, a necessidade da “Responsabilidade Técnica” voltada às Boas Práticas de Fabricação, BPF, para todo estabelecimento responsável pela produção e industrialização de produtos alimentícios.

O primeiro passo para a implantação do sistema APPCC consiste na identificação de perigos e possíveis Pontos Críticos de Controle, PCC, seguida da implantação ou adequação da indústria às BPF.

As BPF, de maneira ampla, são destinadas a produtos, processos, serviços e edificações da indústria, visando, de acordo com normas apropriadas e específicas, a promoção e a certificação de qualidade e segurança do alimento.

Assim, todas as etapas, desde a fabricação até a distribuição dos produtos alimentícios, envolvendo distintas escalas de riscos ou perigos de contaminação, caracterizam objeto das BPF.

Através do presente trabalho, foi efetuado em uma Indústria Mineira de pão de queijo, então designada IMpq, um diagnóstico de suas práticas de fabricação para, a identificação de PCC, e caso fosse necessário, adequá-las as BPF tendo em vista a implantação do sistema APPCC .

## **4 Material e Métodos**

### **4.1 Identificação de PCC e avaliação das práticas de produção em uma IMpq**

Quatro visitas não previamente programadas, realizadas no decorrer do mês de junho de 2000, em dias e horários distintos, perfazendo um total de 20h, foram conduzidas, em caráter de vistoria, tendo em vista o levantamento de dados que permitissem o conhecimento das práticas de fabricação adotadas na IMpq, seguido do diagnóstico dos PCC.

Para tal, adotou-se um Questionário de Inspeção especialmente modificado para este fim, a partir de Bryan (1980, 1993), por meio do qual foram enfocados seis itens, que foram desdobrados em 53 subitens, pertinentes às condições de funcionamento da IMpq e sua produção, conforme se observa na Tabela 1.

Todos estes itens foram pesquisados e a eles, de maneira equânime, foram atribuídos valores de pontuação e conceito. Para cada item considerado foi estabelecida uma pontuação mínima igual a zero e máxima igual a 10. Quanto à conceituação, de forma idêntica, o conceito A (ótimo) foi representado pelo valor situado entre 9,1 a 10; B (bom), de 7,1 a 9,0; C (regular), de 5,1 a 7,0; e D (péssimo), de 0 a 5,0. Considerada a somatória dos seis itens estudados foram, de maneira proporcional, correlacionados valores mínimo e máximo de 0 a 60 pontos, e, igualmente, conceitos de A a D, relativos às ótimas a péssimas condições de funcionamento, desta feita para o enfoque da IMpq, no cômputo geral.

As informações necessárias para o preenchimento do Questionário de Inspeção foram obtidas junto a um total de 13 manipuladores diretamente envolvidos na linha de produção e por criteriosa análise visual.

**TABELA 1** Questionário de Inspeção para identificação de PCC e conhecimento das práticas de fabricação adotadas na IMpq<sup>1</sup>

---

<b>Itens e subitens considerados</b>
<b>Área externa</b>
A água é tratada?
Existe depósito para lixo?
A área está sempre limpa?
As aberturas da indústria são teladas?
Existe um controle regular de pragas?
Existe um refeitório para os funcionários?
Há vegetação e criação de animais nos arredores?
Existe uma área separada para recepção da matéria-prima?
O escoamento de esgoto é feito de forma regulamentar?
Existem instalações sanitárias destinadas aos manipuladores e outros funcionários?
<b>Área de produção</b>
Conserva-se sempre limpa?
Existem lixeiras suficientes?
O lixo é removido com frequência?
Existem sujeiras acumuladas nos ralos?
Existem equipamentos inadequados ou desnecessários?
É observado acúmulo de água no chão, após higienização?
O fluxo do alimento produzido ocorre em um único sentido?
Possuem receita afixada para a observação dos valores a serem pesados?
Existem pias para higiene pessoal providas de sabão líquido e papel toalha?
As lixeiras possuem sacos plásticos, na cor branca, e são providas de pedais para abertura?
<b>Equipamentos e utensílios</b>
A limpeza é realizada diariamente?
Os equipamentos são de fácil limpeza?
Há desmonte dos equipamentos para limpeza?
Produtos de limpeza são utilizados corretamente?
Há um responsável para o acompanhamento da limpeza?
O material de limpeza possui registro e local de depósito?
Há móveis (bancadas, mesas, carrinhos, etc) em número suficiente?
Os utensílios são compostos de materiais inócuos e resistentes?
Há controle da temperatura em “freezer”, geladeira e câmara fria?
Os equipamentos encontram-se em bom estado de funcionamento e/ou conservação?
Recipientes plásticos para transporte de leite, queijo, ovos e óleo são devidamente higienizados?

---

...continua...

TABELA 1, Cont

---

**Manipuladores**

Gozam de boa saúde?

Lavam as mãos com frequência?

Recebem treinamento periódico?

Possuem boa apresentação e asseio corporal?

Apresentam lesões ou supurações de pele?

Portam uniformes na área de produção?

Dispõem de área restrita aos seus objetos particulares?

Possuem o hábito de alimentar-se na área de produção?

Apresentam mãos limpas, unhas cortadas e desprovidas de esmalte?

Ao dar entrada no estabelecimento, os funcionários são obrigados a tomar banho?

---

**Matéria-prima**

São respeitadas as datas de validade?

As temperaturas de chegada são observadas?

As condições de embalagem são observadas?

O armazenamento segue as recomendações do fornecedor?

O depósito atende aos requisitos de condições de estrutura física e de higiene?

É seguida uma correta rotatividade: o primeiro que entra é o primeiro que sai?

Estão aparentemente isentas de agentes físicos, como, pêlos, cabelos, vidros ou metal, etc?

Os estrados que impedem o contato da matéria-prima com o chão são adequados?

---

**Processamento**

Há um fluxograma a ser seguido?

A massa escaudada é mantida tampada até o amassamento?

Após a modelagem a massa é imediatamente congelada?

Após o congelamento a massa é prontamente embalada?

O congelamento é monitorado com tempo e temperatura?

O amassamento, a modelagem e a embalagem são conduzidos mecanicamente?

O produto final é armazenado adequadamente quanto à temperatura e umidade?

Locais para o pré-preparo ("área suja") e preparo ("área limpa") são isolados?

A massa que já foi congelada é reprocessada e embalada novamente para comercialização?

As embalagens das matérias-primas são higienizadas antes de sua utilização?

---

<sup>1</sup>IMpq: Indústria Mineira de pão de queijo; Questionário de Inspeção modificado a partir de Bryan (1981 e 1992); As respostas, sim, em caso positivo, e não, em caso negativo, foram obtidas junto a 13 manipuladores diretamente envolvidos na linha de produção da IMpq; Pontuação mínima igual a zero e máxima igual a 10, para cada item considerado; conceituação: A (ótimo), valor situado entre 9,1 a 10; B (bom), de 7,1 a 9,0; C (regular), de 5,1 a 7,0 e D (péssimo), de 0 a 5,0.

## **5 Resultados e Discussão**

De acordo com a análise visual procedida por quatro vistorias realizadas na IMpq, foi possível registrar irregularidades que envolveram, principalmente, a área de produção, os equipamentos e utensílios, os manipuladores e a matéria-prima, conforme se apresenta.

### **5.1 Área de produção e processamento**

Quando da higienização, após o término de cada turno, observou-se a permanência de poças d'água no chão. Material de limpeza, galões plásticos contendo detergentes, vassouras e rodos, e matéria-prima não perecível, fécula e polvilho de mandioca, soro liofilizado de leite pasteurizado e sal, eram mantidos juntos, dispostos no chão. Produto final congelado, embalado ou não, era mantido junto, sem qualquer critério de separação e ordenamento. A massa de pão de queijo, ao ser transportada para a modeladora, permanecia em recipientes plásticos desprovidos de tampa e à temperatura ambiente. As pias para a higienização de mãos não dispunham de sabão líquido e papel toalha. Por sua vez, as lixeiras, em número insuficiente, não portavam pedais para abertura.

### **5.2 Equipamentos e utensílios**

A higienização de equipamentos e utensílios era procedida de forma desordenada, sem supervisão e planejamento. Os procedimentos de limpeza eram realizados com água fria e detergente neutro. Após este procedimento, as superfícies dos equipamentos e utensílios mantinham a aparência gordurosa e apresentavam restos de material orgânico.

### **5.3 Manipuladores**

De maneira geral, todos os manipuladores conservavam carteiras e documentos pessoais junto ao uniforme de trabalho, pois não dispunham de armários para guardar seus pertences nem área específica para troca de roupas. Observou-se, por mais de uma vez, a presença de manipuladores utilizando uniformes fora da área de produção ou mesmo do recinto da fábrica, ainda quando se transportavam, de ônibus, para o início de expediente na IMpq. Nenhum manipulador praticava a lavagem periódica das mãos, e aqueles responsáveis pelas atividades de ralagem do queijo parmesão e retirada da massa pronta das misturadeiras não faziam uso de máscara e luvas. Por vezes, debicavam matéria-prima e outros ingredientes dentro da área de produção.

### **5.4 Matéria-prima**

As condições de embalagem da fécula e polvilho de mandioca e a temperatura de refrigeração para leite pasteurizado tipo C, queijo parmesão e ovo líquido pasteurizado não eram observadas quando da chegada à área de recepção. Quanto ao estoque da matéria-prima, este se dava de forma incorreta: fécula e polvilho de mandioca eram mantidos em local quente e úmido; queijo parmesão, leite pasteurizado tipo C e ovo líquido pasteurizado eram armazenados em câmara fria, porém em cima de estrados de madeira ou diretamente no piso. No que diz respeito às embalagens, sacos de fécula e polvilho de mandioca e soro liofilizado de leite pasteurizado eram abertos ao mesmo tempo, sem previsão racional de uso. Já o queijo parmesão ralado permanecia exposto em recipientes plásticos desprovidos de tampas e à temperatura ambiente.



## 5.5 Outros

O produto final era liberado ao comércio portando rótulo com dizeres incorretos quanto ao tipo de ingredientes. O rótulo também era desprovido da informação relativa ao número de lote.

As informações advindas do Questionário de Inspeção, respondido por 13 manipuladores envolvidos diretamente na linha de produção, geraram dados que permitiram, através da média de seus valores, a pontuação e conceituação dos seis itens considerados para o diagnóstico do PCC (Tabela 2).

TABELA 2 Pontuação e conceito observados para diferentes itens relativos ao funcionamento da IMpq

Itens considerados	Pontuação	Conceito
Área externa	07	B
Área de produção	05	D
Equipamentos e utensílios	05	D
Manipuladores	05	D
Matéria-prima	04	D
Processamento	07	B

IMpq: Indústria Mineira de pão de queijo; pontuação mínima igual a zero e máxima igual a 10, para cada item considerado; conceituação: A (ótimo), valor situado entre 9,1 a 10; B (bom) de 7,1 a 9,0; C (regular) de 5,1 a 7,0 e D (péssimo) de 0 a 5,0, conforme previsto no *Questionário de Inspeção* modificado a partir de Bryan (1981 e 1992)

Somente para os itens área externa e processamento a IMpq alcançou 07 pontos, que correspondem ao conceito B. Limpeza da área externa, coleta constante de lixo, fluxograma em um único sentido e afixado na área de produção foram observados na avaliação das referidas áreas.

Quanto aos equipamentos, poucas irregularidades foram observadas devido, possivelmente, ao maquinário de tecnologia específica e adequada. A IMpq funcionava com equipamentos especialmente adaptados à produção de pão

de queijo, como uma máquina de ralagem de queijo parmesão; modeladora para a modelagem do produto; túnel de congelamento à base de nitrogênio e empacotadeira da marca “Masipack”. Tais equipamentos reduziam em muito a frequência de manipulação, porém a falha em sua higienização e manutenção determinou sua pontuação e conceituação.

Os outros três itens pesquisados apresentaram igualmente conceito D ficando demonstradas as más condições de funcionamento da IMPq, que, no cômputo geral, para uma pontuação máxima igual a 60, atingiu 33 pontos, que correspondem ao conceito C.

O maior número de irregularidades observadas na área de produção; equipamentos e utensílios; manipuladores e matéria-prima já foram igualmente relatados por Pinto (2001), quando de estudos sobre Boas Práticas de Fabricação em três indústrias de pão de queijo em Belo Horizonte, MG.

Através dos pontos críticos levantados e do conhecimento tomado a respeito das práticas de fabricação adotadas na IMPq, ficou demonstrada a necessidade de controle, sobretudo na área de produção, higienização de equipamentos e utensílios, estoque e manipulação da matéria-prima.

A pronta implantação das BPF, incluindo treinamento específico para manipuladores, mostrou-se necessária, tendo em vista a qualidade e segurança do alimento a ser produzido.



## **6 Referências Bibliográficas**

**BRASIL.** Ministério da Saúde. Secretaria da Vigilância Sanitária, Divisão Nacional de Vigilância Sanitária. Portaria Federal nº1428. **Diário Oficial da União**, Brasília, 02 de dez.,1993.

**BRYAN, F. L.** Foodborne disasesin the United States associated with meat and poultry. **Journal of Food Protection**, Ames, v.43, n.2, p.140-150, Feb. 1980.

**BRYAN, F. L.** Aplicação do método de analyses de risco por pontos críticos de controle, em cozinhas industriais. **Higiene Alimentar**, São Paulo, v.7, n.25, p.15-22, ago/set. 1993.

**PINTO, R.G.** Avaliação das boas práticas de fabricação e da qualidade microbiológica na produção de pão de queijo. 2001. 181p. Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimento) – Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

## **CAPÍTULO 3**

### **Monitoramento da qualidade microbiológica em uma Indústria Mineira de pão de queijo – Superfícies de equipamentos e utensílios**

## 1 Resumo

**MACHADO, Elayne Cristina Monitoramento da qualidade microbiológica em uma Indústria Mineira de pão de queijo – Superfícies de equipamentos e utensílios.** Lavras: UFLA, 2001. 130p. (Dissertação - Mestrado em Ciência dos Alimentos)<sup>1</sup>.

Análise microbiológica de superfícies de equipamentos e utensílios foi procedida em uma Indústria Mineira de pão de queijo, então designada IMPq, com intuito de conferir, em uma primeira etapa, a eficiência dos procedimentos de higienização por ela praticados e, em uma segunda etapa, caso fosse necessário, validar alterações e/ou correções sugeridas à melhoria destes mesmos procedimentos. Desta maneira, esfregaços de superfícies de cinco equipamentos, betoneira, masseira, máquina de ralagem de queijo, modeladora e empacotadora, e dos utensílios, espátulas metálicas e recipientes plásticos, foram realizados utilizando-se a técnica de “swabs”. Os resultados evidenciados na primeira etapa revelaram, para maioria dos equipamentos e utensílios, contagens de  $>2,0 \times 10^5 \text{UFC/cm}^2$ ;  $>1,1 \times 10^3 \text{NMP/cm}^2$ ;  $>1,1 \times 10^3 \text{NMP/cm}^2$ ;  $>2,0 \times 10^5 \text{UFC/cm}^2$   $>2,0 \times 10^5 \text{UFC/cm}^2$ , respectivamente, para bactérias aeróbias mesófilas, coliformes totais, coliformes fecais e estafilococos produtores e não produtores de coagulase. Em função da constatação destes resultados, alterações do procedimento de higienização, que consistiram inicialmente da remoção de detritos orgânicos pela lavagem de superfícies com jatos de água quente, seguida da aplicação de detergente/sanitizante, posterior enxágue com jatos de água quente e borrifamento final de solução de hipoclorito de sódio a 1%, foram introduzidas e monitoradas. Redução de dois ciclos log. na população de bactérias aeróbias mesófilas ( $2,0 \times 10^5 \text{UFC/cm}^2$ ); ausência de coliformes totais e fecais ( $<2,0 \text{NMP/cm}^2$ ) e igualmente ausência de estafilococos produtores e não produtores de coagulase ( $<100 \text{UFC/cm}^2$ ) foram evidenciados, revelando-se a possibilidade de se obterem superfícies microbiologicamente compatibilizadas com as Boas Práticas de Fabricação (BPF).

---

<sup>1</sup>Comitê Orientador: Dr<sup>a</sup> Eliana Pinheiro de Carvalho – UFLA (Orientadora)  
Dr<sup>a</sup> Maria Lucia Pereira – FUNED (Co-orientadora)

## 2 Summary

**MACHADO, Elayne Cristina Monitoring of microbiological quality in a cheese-roll Industry of Minas Gerais - Equipment and implement surfaces. Lavras: UFLA, 2001. 130p. (Dissertation - Master in Food Science)<sup>2</sup>.**

Microbiological analysis of equipment and implement surfaces was made in a cheese-roll industry located in Contagem, MG, for the purpose of checking, at an initial stage, the efficiency of its hygienization practices, and, at a second stage, if that proved necessary, of validating alterations and/or corrections suggested for the improvement of these procedures. Thus, swabbings of the surfaces of five pieces of equipment, mixer, kneader, grating machine, molder, and packager, and of implements, metallic spatulas and plastic containers, were made through the swab technique. The results obtained at the initial stage reveal for the majority of the equipment and implements counts of  $>2.0 \times 10^3$  UFC/cm<sup>2</sup>;  $> 1.1 \times 10^3$  NMP/cm<sup>2</sup>;  $> 1.1 \times 10^3$  NMP/cm<sup>2</sup>;  $> 2.0 \times 10^3$  UFC/cm<sup>2</sup> and  $> 2.0 \times 10^3$  UFC/cm<sup>2</sup>, respectively, for mesophilic aerobic bacteria, total coliforms, fecal coliforms, and staphylococcal coagulase producers and non-producers. In virtue of these results, alterations of hygienization procedures were introduced and monitored, initially consisting of the removal of organic remains through the washing of surfaces with hot water, followed by the applying of sanitizing detergent, another rinsing with jets of hot water, and a final sprinkling of 1% hypochloride sodium solution. Reduction of two log. cycles in the population of mesophilic aerobic bacteria ( $2.0 \times 10^3$  UFC/cm<sup>2</sup>); absence of total and fecal coliforms ( $<2.0$  NMP/cm<sup>2</sup>), and also absence of staphylococcal coagulase producers and non-producers ( $<100$  UFC/cm<sup>2</sup>) were verified, which shows the possibility of obtaining surfaces that are microbiologically compatible with Good Manufacturing Practices (GMP).

---

<sup>2</sup>Guidance Committee: Dr<sup>a</sup> Eliana Pinheiro de Carvalho - UFLA (Major Professor)  
Dr<sup>a</sup> Maria Lúcia Pereira - FUNED (Co-Professor)

### 3 Introdução

Uma grande variedade de equipamentos e utensílios mantém-se em contato com os alimentos, desde o acesso da matéria-prima à indústria até o momento em que o produto final é colocado no mercado e posto à mesa do consumidor.

Os equipamentos e utensílios, quando não fabricados com “lay-out” adequado, podem transformar-se em fatores potenciais de risco. Usualmente, as dificuldades apresentadas no decorrer do processo de higienização, na maioria das vezes, são advindas do acúmulo de resíduos orgânicos, que acabam levando à formação de biofilme.

O biofilme, gerado em decorrência de incorreta higienização, é formado pela fixação, colonização e posterior crescimento bacteriano junto às superfícies, ocorrendo, em seguida, a produção de material extracelular que irá definir ou promover a completa fixação das bactérias.

Contribuindo ainda para a formação de biofilmes, a própria área de produção industrial de alimentos oferece condições de crescimento microbiano, pois o ambiente em si dispõe de altas taxas de umidade e temperatura adequadas (American Public Health Association, Agency Committee on Microbiological Methods for Food, 1992).

Para a instalação de equipamentos e utensílios em indústria de alimentos, deve-se em primeiro lugar observar se os mesmos prestam-se a ser limpos; em segundo lugar, para serem apropriados, devem proteger o alimento de qualquer tipo de contaminação e, em terceiro, os mesmos devem permitir o monitoramento e o controle de suas funções.

Atualmente, a indústria de pão de queijo vem utilizando equipamentos de grande porte, como masseiras, betoneiras, máquinas de ralagem de queijo,

modeladoras, esteiras e empacotadoras que foram introduzidos em decorrência da escala de produção que este produto atingiu, sobretudo na década de 90.

Entretanto, apesar dos avanços tecnológicos, que conferiram ao maquinário de fabrico de pão de queijo especificidade e certa sofisticação, sabe-se que na indústria de alimentos, de maneira geral, equipamentos constituem e são usualmente relatados como causa ou foco de contaminação (Silva Junior, 1997).

Desta maneira, objetivou-se, neste experimento, levado a efeito em uma Indústria Mineira de pão de queijo, então designada IMpq, a avaliação microbiológica de superfícies de equipamentos e outros utensílios.

A pesquisa teve como intuito conferir, em uma primeira etapa, a eficiência dos procedimentos de higienização praticados e, em uma segunda etapa, caso fosse necessário, validar alterações e/ou correções sugeridas à melhoria destes mesmos procedimentos.

## **4 Material e Métodos**

### **4.1 Avaliação dos procedimentos de higienização de superfície de equipamentos e utensílios adotados na IMpq**

Através de contato pessoal com a gerência de produção, tomou-se conhecimento dos procedimentos de higienização de superfície de equipamentos e outros utensílios adotados pela IMpq. Posteriormente, estes mesmos procedimentos foram acompanhados no decorrer da prática de limpeza, que se realizava no final do expediente, quando do término da produção diária de pão de queijo.

### **4.2 Avaliação microbiológica de superfícies de equipamentos e utensílios higienizados**

#### **4.2.1 Tomada de amostras**

Amostras de superfície, área delimitada de aproximadamente 15cm<sup>2</sup>, perfazendo um total de 22, foram tomadas em pontos indicativos de maior contaminação para cada equipamento e utensílio, exceto para máquina de ralagem de queijo, empacotadeira e modeladora, que foram amostradas em função de seus tamanhos, em dois, quatro e três pontos, respectivamente, conforme se verifica na Tabela 1.

As amostras foram tomadas com auxílio de “swabs” embebidas em 15mL de caldo “BHI” acondicionado em tubos de tampa de baquelite. Uma vez realizados os esfregaços, as “swabs” embebidas e mantidas no mesmo tubo foram transferidas, em condições isotérmicas, ao Laboratório<sup>3</sup> e incubadas a 35°C durante 24 horas (Tiedman *et al.* 1994).

---

<sup>3</sup>Sector de Anaeróbios e Epidemiologia Molecular da Divisão de Bromatologia, Toxicologia e Medicamentos (DBTM); Instituto Octávio Magalhães (IOM), Fundação Ezequiel Dias (FUNED) Rua Conde Pereira Carneiro, 80 -Bairro Gameleira - 30510-010, Belo Horizonte, MG-laem@funed.mg.gov.br

**TABELA 1 Distribuição de amostras de superfície de equipamentos e utensílios tomadas na IMpq**

<b>Equipamentos e utensílios</b>	<b>Número</b>	<b>Amostras tomadas (n°)</b>
Betoneira	05	05
Masseira	05	05
Máquina de ralagem de queijo	01	02
Modeladora	01	03
Empacotadeira	01	04
Recipientes plásticos	02	02
Espátula metálica	01	01
<b>Total</b>	<b>16</b>	<b>22</b>

IMpq: Indústria Mineira de pão de queijo

Decorrido o tempo de incubação, diluições seriadas foram procedidas em APT, de forma a se procederem contagens de bactérias aeróbias mesófilas, coliformes totais, coliformes fecais e estafilococos produtores e não produtores de coagulase.

Em se considerando a possibilidade da não adequação dos procedimentos de limpeza das superfícies de equipamentos e utensílios adotados pela IMpq, a correção destes seria introduzida e acompanhada e novas análises microbiológicas seriam procedidas conforme se encontra descrito no item 4.2.

#### **4.2.2 Enumeração de bactérias aeróbias mesófilas, segundo Vanderzant & Splittstoesser (1992)**

A partir do crescimento obtido em caldo "BHI", foram procedidas diluições 1/10, 1/100 e 1/1000 em APT, destas, tomou-se 1mL, que foi, em duplicata, inoculado em placas de Petri, seguindo-se incorporação com "PCA" previamente fundido e estabilizado em banho-maria a 44-46°C. Após homogeneização e solidificação, as placas foram incubadas a 35°C durante 48 horas. Os resultados foram expressos como UFC/cm<sup>2</sup> da amostra tomada.



#### **4.2.3 Determinação do Número Mais Provável (NMP) de coliformes totais e fecais, segundo Vanderzant & Splittstoesser (1992)**

Utilizou-se o método de fermentação de lactose em tubos múltiplos para os quais a partir do crescimento obtido em caldo "BHI", foram procedidas diluições 1/10, 1/100 e 1/1000 em APT; destas, 1mL foi tomado e inoculado em três séries de três tubos contendo na primeira série CLD e nas outras duas CLS.

Após incubação a 35°C durante 48 horas, os tubos presuntivamente positivos, que evidenciaram produção de gases nos tubos de Durham, foram submetidos ao teste confirmatório para enumeração de coliformes totais e fecais, para os primeiros utilizando-se CVB, duplo e simples, e para os segundos, caldo EC, com incubação até 48h, em estufa a 35°C, e em banho-maria a 44,5°C, respectivamente. Os resultados de densidade de coliformes totais e fecais foram expressos em NMP/cm<sup>2</sup> da amostra analisada.

#### **4.2.4 Enumeração de estafilococos produtores e não produtores de coagulase, segundo Vanderzant & Splittstoesser (1992)**

A partir do crescimento obtido em caldo "BHI", foram procedidas diluições 1/10, 1/100 e 1/1000 em APT; destas, tomou-se 0,1mL, que foi, em duplicata, inoculado, com auxílio de alça de Drigalski, sobre superfície de ágar "BP". Após completa incorporação, as placas inoculadas foram incubadas a 37°C durante 48 horas. Decorrido o tempo de incubação, procedeu-se a contagem das placas. Teste de produção de coagulase foi realizado com cerca de 2% das colônias, sendo considerados como estafilococos produtores de coagulase somente tubos com coágulo 4+. Os resultados foram expressos em UFC de estafilococos produtores e não produtores de coagulase/cm<sup>2</sup>.

## **5 Resultados e Discussão**

Os procedimentos de higienização empregados na IMpq não se encontravam registrados sob forma de protocolo e eram transmitidos, de maneira informal, ao pessoal encarregado da higienização de equipamentos e utensílios, sem qualquer acompanhamento ou conferência posterior.

Estes procedimentos consistiam basicamente em uma fase inicial, de remoção grosseira dos resíduos orgânicos aderidos à superfície dos equipamentos e utensílios utilizando jatos de água à temperatura ambiente, aproximadamente 25°C. Em seguida era procedida a esfregagem, com bucha sintética embebida em detergente neutro de uso comum em cozinhas domésticas, e, finalmente, o enxágüe, também com jatos de água à mesma temperatura.

Após o término da limpeza, a superfície da maioria dos equipamentos ainda apresentava sinais da presença de detritos orgânicos, bem como evidenciava a aparência untuosa indicativa de incompleta remoção de óleos e gorduras.

Assim, face aos resultados observados, após a tomada de amostras de superfície dos treze equipamentos e três utensílios, foram introduzidas e acompanhadas as modificações e correções que se fizeram necessárias aos procedimentos de higienização para, em seguida, promover nova amostragem das mesmas superfícies anteriormente pesquisadas.

O procedimento de higienização de superfícies de equipamentos e utensílios propostos previu a aplicação de jatos de água aquecida, aproximadamente 37°C, seguida de esfregagem, com auxílio de bucha sintética embebida em detergente/sanitizante neutro de uso industrial, enxágüe com jatos de água aquecida à mesma temperatura e, finalmente, borrifamento de solução aquosa de hipoclorito de sódio a 1%, de acordo com Silva Junior (1997).

Este último procedimento, uma vez protocolado, foi então transferido à gerência de produção e ao pessoal encarregado da higienização e acompanhado no decorrer da prática de limpeza, que se realizou por uma única vez ao final do expediente, quando do término da produção diária de pão de queijo.

Os resultados microbiológicos para superfície de equipamentos e utensílios evidenciados na primeira etapa, de acordo com procedimento de higienização praticado na IMpq, e na segunda etapa, de acordo com procedimento de higienização modificado e introduzido, encontram-se transcritos na Tabela 2.

Os dados microbiológicos gerados na primeira etapa evidenciaram densidade populacional significativamente mais elevada para todos os microrganismos pesquisados, em relação àqueles revelados na segunda etapa, conforme higienização segundo procedimento modificado.

Excetuando-se os resultados relativos à ausência de coliformes totais e coliformes fecais, 2,0NMP/cm<sup>2</sup> para betoneiras, e dos obtidos para espátula metálica, as quatro modalidades de equipamentos e os dois recipientes plásticos apresentaram, igualmente,  $>2,0 \times 10^5$  UFC/cm<sup>2</sup>;  $1,1 \times 10^3$  NMP/cm<sup>2</sup>;  $1,1 \times 10^3$  NMP/cm<sup>2</sup> e  $>2,0 \times 10^5$  UFC/cm<sup>2</sup>, respectivamente, para bactérias aeróbias mesófilas, coliformes totais, coliformes fecais e estafilococos não produtores de coagulase.

Estes resultados são incompatíveis com as exigências da American Public Health Association, Agency Committee on Microbiological Methods for Food, 1992, e confirmaram a ineficiência dos procedimentos de higienização adotados pela IMpq.

**TABELA 2 Avaliação microbiológica da superfície de equipamentos e utensílios disponíveis na IMPq**

Equipamentos e utensílios (nº)	Bactérias aeróbias mesófilas (UFC/cm <sup>2</sup> )	Coliformes totais NMP/cm <sup>2</sup>	Coliformes fecais NMP/cm <sup>2</sup>	Estafilococos não produtores de coagulase (UFC/cm <sup>2</sup> )	Estafilococos produtores de coagulase (UFC/cm <sup>2</sup> )
<b>De acordo com higienização, praticada da IMPq</b>					
Betoneiras (05)	2,0 x 10 <sup>5</sup>	2,0	2,0	2,0 x 10 <sup>5</sup>	< 100
Masseiras (05)	"	1,1 x 10 <sup>3</sup>	1,1 x 10 <sup>3</sup>	"	2,0 x 10 <sup>4</sup>
Pingadeira (01)	"	"	"	"	< 100
Máquina de ralagem (01)	"	"	"	"	"
Empacotadeira (01)	"	"	"	"	"
Recipientes plásticos (02)	"	"	"	"	"
Espátula metálica (01)	"	"	2,0	< 100	"
<b>De acordo com higienização, segundo procedimento modificado</b>					
Betoneiras (05)	2,0 x 10 <sup>3</sup>	2,0	2,0	< 100	< 100
Masseiras (05)	"	"	"	2,0 x 10 <sup>3</sup>	"
Pingadeira (01)	"	"	"	< 100	"
Máquina de ralagem (01)	"	"	"	2,0 x 10 <sup>2</sup>	"
Empacotadeira (01)	"	"	"	< 100	"
Recipientes plásticos (02)	"	"	"	2,0 X 10 <sup>2</sup>	"
Espátula metálica (01)	"	"	"	< 100	"

IMPq: Indústria Mineira de pão de queijo; “: idem; Análises realizadas em triplicata, segundo a técnica de esfregaços, de acordo com Tiedman (1994) e Vanderzant & Splittstoesser (1994); Resultados expressos através de valores médios relativos a esfregaços tomados para cada equipamento e utensílio, exceto para máquina de ralagem de queijo, empacotadeira e pingadeira que foram amostradas em dois, quatro e três pontos, respectivamente

As modificações e correções introduzidas ao procedimento de higienização de equipamentos e utensílios resultaram em não detecção de bactérias do grupo coliformes totais, coliformes fecais e estafilococos produtores de coagulase; estes últimos haviam se mostrado presentes, com exclusividade, nas masseiras, em índice populacional de >2,0 x 10<sup>4</sup> UFC/cm<sup>2</sup>.

Quanto às bactérias aeróbias mesófilas, ocorreu um decréscimo na contagem, que era de >2,0 x 10<sup>5</sup> UFC/cm<sup>2</sup>, passando a >2,0 x 10<sup>3</sup> UFC/cm<sup>2</sup>, reduzindo-se, portanto, em dois ciclos log.

Quanto aos estafilococos não produtores de coagulase, não foram encontrados nas betoneiras, modeladora e empacotadeira e sofreram decréscimo de dois, três e três ciclos para as masseiras, máquina de ralagem de queijo e recipientes plásticos, respectivamente.

Os resultados microbiológicos mostraram-se de acordo com as recomendações da American Public Health Association, Agency Committee on Microbiological Methods for Food (1992), exceto no que diz respeito à enumeração de bactérias aeróbias mesófilas, para as quais o valor recomendado é de  $<2,0\text{UFC}/\text{cm}^2$ .

Estas três modalidades de equipamentos disponíveis na IMPq, enfatizando-se sobretudo, as duas primeiras, masseiras e máquina de ralagem de queijo, compõem o maquinário mais susceptível à contaminação. Isto se deve ao contato mais estreito dos manipuladores com estes equipamentos, quer seja quando da mistura da massa, ou no momento da ralagem do queijo parmesão. Microbiologicamente, a contaminação foi confirmada, pela elevada contagem, sobretudo de estafilococos produtores de coagulase, presentes em proporções indicativas até mesmo da possibilidade de ocorrência de intoxicação estafilocócica (Bergdoll, 1989).

Em trabalhos com superfícies de bancadas da Feira Livre de Pescados e de um Restaurante Universitário, localizadas, respectivamente, em Fortaleza, CE, e Porto Alegre, RS, foi caracterizado *Staphylococcus aureus* e aventada a hipótese de sua origem advir do contato de manipuladores portadores de afecções cutâneas e respiratórias e, ainda, das deficitárias condições de higiene e sanificação de utensílios (Vieira *et al.* 1998; Brugalli *et al.* 2000)

Em se considerando a situação particular da IMPq, que executava a higienização de seus equipamentos e utensílios através de procedimentos não eficazes, conforme se confirmou nos resultados microbiológicos evidenciados através da primeira etapa, é possível inferir que seu maquinário necessitaria de

uma rotina ou prática constante de higienização. Esta prática não se deu, uma vez que, para a validação do procedimento modificado e introduzido, as análises microbiológicas foram executadas tomando-se como base apenas uma primeira higienização.

Desta maneira, no que diz respeito às contagens de bactérias aeróbias mesófilas, que após o processo de higienização introduzido tiveram redução de apenas dois ciclos log., podem ser atribuídas a uma possível presença de biofilme, o qual, através de único processo de higienização, mesmo correto e adequado, poderia não ter sido removido.

Pesquisa conduzida por Pinto (2001) em Indústria de pão de queijo, em Belo Horizonte, MG, revelou, para as superfícies de maquinário idêntico, presença de bactérias aeróbias mesófilas e bactérias do grupo coliforme, que se mantiveram mesmo após efetuado o processo de higienização proposto.

Através da tomada de conhecimento e acompanhamento dos procedimentos de higienização adotados pela IMpq, no que diz respeito aos resultados microbiológicos de seus equipamentos e utensílios, pôde-se observar a necessidade de sua correção e modificações.

## 6 Referências Bibliográficas

BERGDOLL, M. S. *Staphylococcus aureus*. In: Doyle, M.P. (ed). **Foodborne bacteriology pathogens**. New York: Marcel Bekker, 1989. p.463-523,.

BRUGALLI, A.; PINTO, J.M.; TONDO, E.C. Análise de perigos e pontos críticos de controle para garantir a segurança alimentar em restaurante da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. **Higiene alimentar**, São Paulo, v.14, n.72, p.53-59, maio 2000.

SILVA, E.R.J. **Manual de controle higiênico-sanitário em alimentos**. 2.ed. São Paulo: Varela, 1997. 385p.

PINTO, R.G. **Avaliação das boas práticas de fabricação e da qualidade microbiológica na produção de pão de queijo**. 2001. 181p. Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimento) – Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

TIENDMAN, W.D. A proposed method for control of food utensil sanitation. **Journal Public Healthy**, South Burlmngton, v.34, p.225-251, 1994.

VANDERZANT, C; SPLITTSTOESSER, D. F. **Compedium of Methods for the microbiological examination of foods**. 3 ed. Washington, DC.: APHA, 1992. 1219p.

VIEIRA, M.C.M.; ANDRÉ M.C.D.P.B.; SERAFINI, A.B.; LIMA, S.V.; SILVA, E.V. Avaliação microbiológica do leite pasteurizado tipo C, comercializado no estado de Goiás no período de Janeiro a Junho de 2000. **Higiene alimentar**, São Paulo, v.15, n.81, p.94, jan/fev. 2001.

## **CAPÍTULO 4**

### **Pesquisa de estafilococos enterotoxigênicos em manipuladores de uma Indústria Mineira de pão de queijo**



## 1 Resumo

**MACHADO, Elayne Cristina Pesquisa de estafilococos enterotoxigênicos em manipuladores de uma Indústria Mineira de pão de queijo.** Lavras: UFLA, 2001. 130p. (Dissertação - Mestrado em Ciência dos Alimentos)<sup>1</sup>.

Os estafilococos, mesmo colonizando diferentes regiões do organismo, no homem e animais de sangue quente, apresentam predominância pelas mucosas das fossas nasais, cavidade orofaríngea, mãos e outras superfícies, nestas últimas como resultado de vínculo epidemiológico decorrente dos principais sítios. Desta maneira, o portador, assintomático ou não, enquanto manipulador de alimentos, desempenha importante elo na cadeia epidemiológica de intoxicação alimentar. Examinaram-se, assim, neste experimento, manipuladores diretamente envolvidos na linha de produção de uma Indústria Mineira de pão de queijo, então designada IMPq, quanto à presença de estafilococos enterotoxigênicos. Os resultados obtidos evidenciaram que dos treze manipuladores avaliados, quatro destes, 30,7%, mostraram-se portadores de estafilococos enterotoxigênicos, sendo “SEA” e “SEB”, indistintamente, detectadas nos três sítios pesquisados. Das 32 cepas de estafilococos enterotoxigênicos isoladas, todas se mostraram produtoras de “SEA” e 16 e 50% produziam “SEB” concomitantemente. Somente 08 cepas, 25%, não produziam as enzimas coagulase e termonuclease, tratando-se possivelmente das 24 linhagens restantes de *Staphylococcus aureus*. Os quatro portadores identificados desempenhavam funções nas etapas de homogeneização, ralagem de queijo parmesão e empacotamento para uma produção diária de 6t de pão de queijo congelado, ficando demonstradas as possibilidades de contaminação do produto em suas mais diferentes fases de processamento.

---

<sup>1</sup>Comitê Orientador: Dr<sup>a</sup> Eliana Pinheiro de Carvalho – UFLA (Orientadora)  
Dr<sup>a</sup> Maria Lucia Pereira – FUNED (Co-orientadora)

## 2 Summary

**MACHADO, Elayne Cristina Study of enterotoxigenic staphylococci on food-handlers in a cheese-roll Industry of Minas Gerais. Lavras: UFLA, 2001. 130p. (Dissertation - Master in Food Science)<sup>2</sup>.**

Staphylococci, while colonizing different regions of the organism, show predominance in man and warm-blooded animals, in the mucuous of the nasal cavities, oropharyngeous cavity, and on the hands and other surfaces, the latter as a result of an epidemiological connection deriving from the main sites. Thus, the bearer, whether or not symptomatic, as a food-handler is an important link in the epidemiological chain of food poisoning. In this experiment, therefore, handlers directly involved in the production line of a cheese-roll industry in Minas Gerais were examined for the presence of enterotoxigenic staphylococci, with "SEA" and "SEB," indistinctly, detected on the three sites studied. Of the 32 clusters of enterotoxigenic staphylococci isolated, all showed themselves to be producers of "SEA," and sixteen, 50%, producers of "SEB, concomitantly. Only eight clusters, 25%, did not produce the coagulase and thermonculease enzymes, being possibly the 24 remaining lines of *Staphylococcus aureus*. The four bearers identified were employed on the stages of homogenization, cheese-grating, and packaging for a daily product of 6 t of frozen cheese-rolls, demonstrating the possibilities of contamination of the dairy product at its different phases of processing.

---

<sup>2</sup>Guidance Committee: Dr<sup>a</sup> Eliana Pinheiro de Carvalho - UFLA (Major Professor)  
Dr<sup>a</sup> Maria Lúcia Pereira – FUNED (Co-Professor)

### 3 Introdução

Os estafilococos, mesmo colonizando diferentes regiões do organismo, no homem e animais de sangue quente, apresentam predominância nas mucosas das fossas nasais, cavidade orofaríngea, mãos, leito sub-ungêal e outras superfícies, nestas últimas como resultado de vínculo epidemiológico decorrente dos principais sítios (Kloos & Schleeifer, 1986; Raddi *et al.* 1988).

A partir do homem, os estafilococos tornam-se facilmente dissemináveis aos alimentos, distribuindo-se também no ambiente, vindo a constituir problema em hospitais, consultórios odontológicos e indústrias de alimentos (Baird-Parker, 1994).

A relação entre estafilococos, sobretudo *Staphylococcus aureus*, e hospedeiro tornar-se-á ainda mais estreita quando barreiras naturais de proteção da pele e mucosa mostrarem-se comprometidas, como quando da presença de lesões cutâneas e em casos de afecções respiratórias (Kloos, 1980).

Desta maneira, o portador de estafilococos, assintomático ou não, enquanto manipulador de alimentos, vem representar indiscutível elo na cadeia epidemiológica da intoxicação alimentar. Isto pode vir a ocorrer devido ao fato de os estafilococos, além de outras toxinas e enzimas, serem capazes de produzir enterotoxinas.

As enterotoxinas estafilocócicas, “SE”, em sua maioria produzidas por *S.aureus*, possuem natureza termoestável, são antigenicamente específicas e foram, até o presente momento, alfabeticamente designadas de “SEA” até “SEJ” (Bergdoll, 1989; Pereira, 1995; Balaban *et al.* 2000).

Ampliando o perfil epidemiológico de estafilococos em portadores humanos, alguns autores já relataram a presença de espécies coagulase negativas

também produtoras de enterotoxinas (Danielson & Helberg, 1984; Pereira *et al.* 1995; Oliveira *et al.* 1995).

Examinaram-se, assim, neste experimento, manipuladores diretamente envolvidos na linha de produção de uma Indústria Mineira de pão de queijo, ora designada IMpq, quanto à presença de estafilococos enterotoxigênicos, tendo em vista a avaliação das condições higiênico-sanitárias e práticas de fabricação adotadas pela indústria em questão.

## 4 Material e Métodos

### 4.1 Tomada de amostras

Material clínico de fossas nasais, cavidade orofaríngea e leitos sub-ungueais de manipuladores diretamente envolvidos na linha de produção da IMPq foi coletado no decorrer do mês de julho de 2000.

Treze manipuladores, somente três de sexo feminino, ora identificados de A a M, exerciam atividades relacionadas à pesagem da matéria-prima, escaldo do polvilho e fécula de mandioca, ralagem do queijo parmesão, homogeneização da massa nas masseiras, após introdução de leite, queijo parmesão ralado e ovo líquido; modelagem da massa pronta, congelamento e empacotamento do produto final.

O material clínico de cada manipulador, originado de cada um dos três sítios, foi coletado, de forma individual, através de esfregaços com auxílio de "swabs", em tubos de tampa de baquelite contendo 15mL de caldo "BHI" acrescido de 10% de NaCl.

Uma vez realizados os esfregaços, perfazendo um total de 39, as amostras foram encaminhadas, em condições isotérmicas, ao Laboratório<sup>3</sup>, para posterior incubação a 35°C durante 24 horas (Pereira *et al.* 1994).

---

<sup>3</sup>Setor de Anaeróbios e Epidemiologia Molecular, Divisão de Bromatologia, Toxicologia e Medicamentos (DBTM), Instituto Octávio Magalhães (IOM), Fundação Ezequiel Dias (FUNED) Rua Conde Pereira Carneiro, 80 Bairro Gameleira 30510-010 Belo Horizonte, MG laem@funed.mg.gov.br

## 4.2 Pesquisa de estafilococos enterotoxigênicos

### 4.2.1 Caracterização morfológica e bioquímica de estafilococos

Decorrido o tempo de incubação, tomou-se cerca de 1mL de cada cultura proveniente de cada sítio, de forma a se constituir um “pool” de cada manipulador.

Realizou-se então semeadura do crescimento obtido por estrias, com auxílio de alça de níquel-cromo, em placas de ágar “BP”, com posterior incubação a 37°C, durante 48 horas.

Após período de incubação, procedeu-se a avaliação das placas, verificando-se a presença de colônias típicas e atípicas. Colônias típicas, de coloração negra, puntiformes e circundadas por um halo branco opaco e outro, mais externo, transparente; e colônias atípicas, cinzentas, mucóides e desprovidas de halo e negras, com apenas um halo, foram pescadas, em número de cinco e três, para as primeiras e as segundas, respectivamente.

Posteriormente, estas colônias, de forma a se definir ou não *S.aureus*, foram caracterizadas quanto à produção de coagulase e termonuclease e quanto à capacidade de lisar hemácias de carneiro e de utilizar glicose e manitol, em condições de anaerobiose.

### 4.2.2 Produção e detecção de enterotoxinas estafilocócicas

Após caracterização bioquímica, as colônias, produtoras ou não de coagulase, foram submetidas aos ensaios de produção e identificação de enterotoxinas.

Cerca de 0,5mL de culturas jovens crescidas em caldo “BHI” foram transferidos e espalhados, com auxílio de alça de Drigalski, sobre superfície de ágar “BHI”- 2x recoberto com membrana de diálise, e incubadas 37°C por 24 horas (Hallander, 1965; Casman *et al.* 1969 e Jarvis & Lawrence, 1970). Após

o período de incubação, lavagem para recuperação do crescimento bacteriano foi realizada com 2,5mL de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0,01M, em três etapas, utilizando-se 1mL, 1mL e 0,5mL do tampão. O líquido de lavagem obtido foi centrifugado a 7400g, durante 20 minutos, a -4°C, e o sobrenadante utilizado para averiguação de produção de enterotoxinas.

Neste procedimento, através do ensaio de “RPLA” (Igarashi *et al.* 1986), 25µL da amostra a ser pesquisada foram aplicados em orifícios de placa de microtítulo e, em seguida, adicionados de outros 25µL de partículas de látex sensibilizadas com antitoxinas específicas, tomando-se o cuidado da prévia adição de 5% de IgG normal de coelho ao extrato sobrenadante de cultura, para evitar a formação de reações inespecíficas (Ey *et al.* 1978; Pereira, 1995). A placa de microtítulo, uma vez inoculada, permaneceu por 18h à temperatura ambiente, sem agitação.

## 5 Resultados e Discussão

A análise do material clínico dos 13 manipuladores examinados revelou em 100% destes, a presença de estafilococos no “pool” procedente de suas fossas nasais, cavidade orofaríngea e leitos sub-ungüiteais.

De um total de 104 cepas identificadas, 56 o correspondente a 54%, mostraram-se não produtoras de coagulase.

Trinta e duas linhagens revelaram-se enterotoxigênicas, das quais 24 evidenciaram produção das enzimas coagulase e termonuclease, ficando sugerida a possibilidade de se tratarem de *S.aureus*.

Os dados reportados na Tabela 1 demonstram o perfil de enterotoxigenicidade, expressão de crescimento de colônias em ágar “BP” e ainda identificam os quatro portadores do microrganismo, segundo função exercida na IMpq.

Os manipuladores, de referência A, responsabilizavam-se pela etapa de homogeneização da massa; H e M pela ralagem de queijo parmesão e J pela modelagem da massa pronta.

Estabelecendo-se uma correlação com os dados apresentados no Capítulo 3, p. 49, desta mesma dissertação, é possível supor um possível elo de contato entre a contaminação verificada nas superfícies de equipamentos e a presença de manipuladores portadores de estafilococos.

No que diz respeito à presença de estafilococos coagulase negativos todas as cinco superfícies apresentaram o microrganismo, o que igualmente se deu com todos os 13 manipuladores examinados.

Já no que tange aos estafilococos enterotoxigênicos e produtores de coagulase, o manipulador de referência A era o mesmo que exercia suas atividades junto à homogeneização da massa escaldada com leite pasteurizado



tipo C, queijo parmesão ralado e ovo líquido pasteurizado nas masseiras, cujas superfícies apresentaram população de  $>2,0 \times 10^4$  UFC/cm<sup>2</sup> do mesmo microrganismo.

A importância da presença de portadores de estafilococos enterotoxigênicos enquanto manipuladores em indústria de alimentos vem sendo tratada por diferentes autores. No Brasil, entretanto, estes trabalhos ainda podem ser considerados escassos, talvez pelas dificuldades e custos relativos à detecção de enterotoxinas (Danielson & Helberg, 1984; Pereira *et al.* 1994).

TABELA 1 Portadores de estafilococos enterotoxigênicos identificados em manipuladores da IMpq

Manipuladores		Crescimento em ágar "BP"	Ensaio bioquímico					"SE" detectadas
Função / Referência			Coag	Glic	Man	Hem	Tnase	
Homogeneização da massa	A	AT	+	+	+	+	+	"SEA"
Ralagem de queijo	H	T	+	+	+	+	+	"SEA" e "SEB"
	M	T	+	+	+	+	+	"SEA"
Modeladora "Masipack"	J	T	-	+	+	-	-	"SEA" e "SEB"

IMpq: Indústria Mineira de pão de queijo; T: colônias típicas – coloração negra, puntiformes e circundadas por um halo branco opaco e outro, mais externo, transparente; AT: colônias atípicas – cinzentas, mucóides e desprovidas de halo ou negras, com apenas um halo; Coag.: coagulase; Glic. e Man.: glicose e manitol, em anaerobiose; Hem.hemólise; Tnase: termonuclease; "SE": enterotoxina estafilocócica; +: positivo; -: negativo

## 6 Referências Bibliográficas

BALABAN, N.; RASOOLY, A. Review Staphylococcal enterotoxins. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v.61, n.1, p.1-10, Oct. 2000.

BAIRD-PARKER, A.C. Foods and microbiological risks. **Microbiology**, Reading, v.140, n.6, p.687-695, June 1994.

BERGDOLL, M. S. *Staphylococcus aureus*. In: Doyle, M.P. (ed). **Foodborne bacterial pathogens**. New York: Marcel Bekker, 1989. p.463-523.

CASMAN, E.P.; BENNET, A.E.; DORSEY, A.E. The microslide gel double gel diffusion test for the detection and assay of staphylococcal enterotoxins. **Health Laboratory Science**, Washington, v.6, n.4, p.185-198, 1969.

DANIELSON, M.L. & HELBERG, B. Prevalence of enterotoxigenic staphylococci in nose, throat and skin lesions in meat-workers. **Acta Veterinaria Scandinavica**, Copenhagen, v.25, n.2, p.242-249, 1984.

EY, P.L.; PROWSE, S.J.; JENKEN, C.R. Isolation of pure IgG1, IgG2a and IgG2b immunoglobulins from mouse serum using protein A-Sepharose. **Biochemistry**, Washington, v.15, n.8, p.429-436, Apr. 1978.

HALLANDER, H.O. Production of large quantities of enterotoxin B and other staphylococcal toxins on solia media. **Acta Pathologica Microbiologica Scandinavica**, Copenhagen, v.63, n.2, p.299-305, 1965.

IGARASHI, H.; FUJIKAWA, H.; SHINGAKI, M. et al. Latex agglutination test for staphylococcal toxic shock syndrome toxin-1. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v.23, n.2, p.509-512, Mar. 1986.

JARVIS, A.W. & LAWRENCE, R.C. Production of high titers of enterotoxins for the routine testing of staphylococci. **Applied of Microbiology**, Washington, v.19, n.6, p.698-699, June 1970.

KLOSS, W.E. Natural populations of the genus *Staphylococcus* **Annual Review of Microbiology**, Palo Alto, v.34, p.559-592, 1980.

KLOOS, W.E.; SCHLEIFER, K.H. Genus IV. *Staphylococcus* Rosenbach 1884, 18AL, (Nom. cons. Opin. 17 Jud. comm. 1958, 153). In: SNEATH, P.H.A.; MAIR, N.S.; HOLT, J.G. (Ed.). *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, Baltimore: Williams & Williams, 1986. v. 2.

OLIVEIRA, K.M.P. et al. *Staphylococcus warneri* e *Staphylococcus epidermidis* enterotoxigênicos isolados de manipuladores de alimentos. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MICROBIOLOGIA, 18., 1995, Santos. Anais... Santos [s.n.], 1995. p.37.

PEREIRA, M.L.; CARMO, L.S.; LARA, M.A. et al Enterotoxigenic staphylococci from food handlers working in an industrial kitchen in Belo Horizonte, MG (Brazil). *Revista de Microbiologia*, São Paulo, v. 25, n.4, p.274-278, out/dez. 1994.

PEREIRA, M.L.; CARMO, L.S.; SANTOS, E.J. et al. Staphylococci in breast milk from women with and without mastitis. *Revista Microbiologia*, São Paulo, v.26, n.2, p.117-120, abr/jun. 1995

PEREIRA, M. L. *Estafilococos coagulase negativos pauciprodutores de enterotoxinas e relato de um surto por espécie coagulase positiva*. 1996. 143p. Tese (Doutorado em Ciência dos Alimentos) – Universidade Estadual de Campinas, Campinas.

RADDI, M.S.G.; LEITE, C.Q.F.; MENDONÇA, C.P. *Staphylococcus aureus* portadores entre manipuladores de alimentos. *Revista de Saúde Pública*, São Paulo, v.22, n.1, p.36-40, fev. 1988.

## **CAPÍTULO 5**

### **Monitoramento da qualidade microbiológica em uma Indústria Mineira de pão de queijo – Matéria-prima, produto intermediário e final**

## 1 Resumo

**MACHADO, Elayne Cristina Monitoramento da qualidade microbiológica em uma Indústria Mineira de pão de queijo – Matéria-prima, produto intermediário e final. Lavras: UFLA, 2001. 130p. (Dissertação - Mestrado em Ciência dos Alimentos)<sup>1</sup>.**

Estudo de acompanhamento microbiológico foi realizado em uma Indústria Mineira de pão-de-queijo, então designada IMpq. Para a realização deste estudo, tomou-se como direcionamento o fluxograma de produção que, basicamente, se atinha às etapas de recepção e pesagem da matéria-prima; escaldamento, homogeneização, modelagem e congelamento da massa e empacotamento do produto final. A partir de falhas de produção identificadas através de vistorias previamente conduzidas e programadas em conformidade com o sistema APPCC, análises foram realizadas, em uma primeira etapa, com o objetivo de se confirmar microbiologicamente tais falhas. Posteriormente, novas análises foram realizadas, no decorrer de três semanas consecutivas, em uma segunda etapa, para acompanhamento e validação das medidas corretivas propostas e implantadas. Os resultados microbiológicos evidenciados através da primeira etapa revelaram inadequação da fécula de mandioca, leite pasteurizado tipo C, soro liofilizado de leite pasteurizado e queijo parmesão aos padrões legais vigentes, no que diz respeito às contagens de *Bacillus cereus*, coliformes fecais e estafilococos produtores de coagulase. Contagens dos dois últimos grupos de microrganismos mantiveram-se igualmente inadequadas tanto para o produto intermediário, massa de pão-de-queijo coletada nas etapas de escaldamento, homogeneização, modelagem e congelamento, como para o produto final, embalado ou não. Após a implantação das medidas corretivas voltadas principalmente às condições de estoque e manejo da matéria-prima; adequação de limpeza na área de produção; higiene e sanificação de equipamentos; postura dos manipuladores e acertos no processamento e seu fluxo, novo perfil microbiológico foi observado para todos os itens estudados. Foi verificada significativa redução na contagem de coliformes fecais e de estafilococos produtores de coagulase no queijo parmesão, sobretudo após raspagem e lavagem de sua superfície externa por manipuladores munidos de máscara e luvas. Uso racional da fécula de mandioca, caracterizado principalmente pela adequação da área de estocagem e manipulação, controlou

---

<sup>1</sup>Comitê Orientador: Dr<sup>a</sup> Eliana Pinheiro de Carvalho – UFLA (Orientadora)  
Dr<sup>a</sup> Maria Lucia Pereira – FUNED (Co-orientadora)

as contagens elevadas de *B.cereus*. Quanto ao leite pasteurizado tipo C, em virtude de sua má qualidade, foi sugerido, com eficiência, o tratamento térmico de fervura durante 5 min. O conjunto de medidas, em consonância com as BPF, introduzidas e microbiologicamente monitoradas na IMpq, permitiu a adequação da matéria-prima, do produto intermediário e do produto final, e ainda confirmou a vida-de-prateleira do produto, estimada em 180dias, a  $-18^{\circ}\text{C}$ .

## 2 Summary

MACHADO, Elayne Cristina **Monitoring of microbiological quality at a cheese-roll Industry in Minas Gerais – Raw material, intermediate and final product.** Lavras: UFLA, 2001, 130p. (Dissertation - Master in Food Science)<sup>2</sup>.

An accompanying microbiological study was made in a cheese-roll industry of Minas Gerais. For this analysis, the production flow-chart was taken as a guide, which is basically tied to the stages of reception and weighing of the raw material: scalding, homogenization, and molding of the dough; freezing and packaging of the final product. Starting from the production flaws identified through previously conducted inspections and programmed in accordance with the method HACCP, analyses were made, at an initial stage, for the purpose of a microbiological confirmation of these flaws. Later, new analyses were made, at a second state that lasted three consecutive weeks, to check and validate the corrective measures that were proposed and implanted. The microbiological results at the first stage showed that the manioc flour, grade C pasteurized milk, liophyllic whey of the pasteurized milk, and parmesan cheese, were unsatisfactory according to current legal standards, as regards the counts of *Bacillus cereus*, fecal coliforms, and staphylococcal coagulase producers. Counts of the last two groups of micro-organisms were equally unsatisfactory, both for the intermediate product, cheese-roll dough collected at the stages of scalding, homogenization, and molding, and for the final frozen product, whether packaged or not. After the implantation of corrective measures aimed principally at storing conditions and handling of the raw material, adequate cleaning in the production area, hygiene and sanitizing of equipment, behavior of handlers, and adjustments in processing and flow, a new microbiological profile was observed for all the items studied. A significant reduction in the fecal coliform and staphylococcal coagulase producer count in the parmesan cheese was verified, especially after scraping and washing of the outer surface by handlers wearing mask and gloves. Rational use of manioc flour, characterized mainly by adequate areas of storage and handling, controlled the elevated counts of *B. cereus*. As regards the low quality of the grade C pasteurized milk, a thermal treatment of boiling for five minutes was efficiently introduced. This set of measures, together with the GMP introduced and microbiologically monitored at the IMPq, allowed for satisfactory raw materials, and intermediate and final product, as well as confirming the shelf life of the product, estimated at 180 days.

---

<sup>2</sup>Guidance Committee: Dr<sup>a</sup> Eliana Pinheiro de Carvalho - UFLA (Major Professor)  
Dr<sup>a</sup> Maria Lúcia Pereira – FUNED (Co-Professor)

### 3 Introdução

A qualidade da matéria-prima influencia diretamente na qualidade dos produtos industrializados e em uma indústria de alimentos são consideradas as maiores fontes de contaminação microbiana. Matéria-prima de má qualidade origina produtos comprometidos, reduzindo, assim, sua vida comercial e depreciando-o perante o consumidor.

O pão de queijo apresenta, em sua formulação básica, polvilho azedo e fécula de mandioca, queijo de “meia cura”, leite, sal, ovos e óleo. Existem diferenças entre uma formulação e outra e estas podem residir na escolha de algumas matérias-primas, no processamento e até mesmo no modo de assar.

Sob o aspecto microbiológico, o pão-de-queijo está susceptível a diferentes fontes de contaminação, podendo se destacar, entre os patógenos, sobretudo *Staphylococcus aureus*, *Salmonella* sp. e *Listeria monocytogenes*, conforme proveniência mais provável do leite, queijo e ovos, produtos de origem animal.

Além da matéria-prima, o processamento é considerado ponto crítico de contaminação, uma vez que este produto, principalmente ao ser homogeneizado, entra em contato com superfícies de equipamentos e utensílios e até mesmo com os próprios manipuladores.

Para o processamento do pão de queijo, a primeira etapa consiste na recepção e manejo da matéria-prima, em que devem ser observadas as condições de embalagem, temperatura e aparência em que esta se encontra; uma vez inspecionada, a matéria-prima deverá ser armazenada de acordo com suas necessidades, e ainda, quando da pesagem, obedecida a escala de produção do dia. A segunda etapa consiste no esaldamento para promover a gelatinização do amido disponível no polvilho azedo e fécula de mandioca, através da adição de mistura fervente de água, óleo, margarina e sal.



Após a homogeneização do escaldo, este será transferido até as masseiras, onde receberão leite, ovos e queijo ralado, formando uma massa homogênea. Esta massa é então levada até a modeladora, onde tomará formas de “bolas”, que serão imediatamente congeladas, empacotadas e armazenadas, sob temperatura controlada, para posterior distribuição ao consumo.

Com uma vida-de-prateleira prescrita, em média, de 180 dias, uma vez descongelado, o pão de queijo industrializado, usualmente em embalagens plásticas de 500g, deverá ser assado em forno alto a 180°C, durante 30 minutos, aproximadamente, e tão logo consumido.

Até o momento, não existem dados de literatura que incriminem o pão-de-queijo em processos de intoxicação alimentar, possivelmente em função de o alimento ser submetido, antes do consumo, a tratamento térmico adicional. Todavia, pelo fato de constar em sua formulação ingredientes ricos como leite, queijo e ovo, somados ao estreito contato com manipuladores, quer seja no momento da ralagem e adição do queijo, na fase de homogeneização ou na retirada do produto intermediário das masseiras, existe possibilidade real de transferência microbiana de um substrato a outro, o que vem a caracterizar a possibilidade de contaminação cruzada.

Desta maneira, a partir de falhas de produção previamente identificadas através de vistorias conduzidas e programadas em conformidade com o sistema APPCC, objetivou-se, neste experimento, o monitoramento da qualidade microbiológica em uma Indústria Mineira de pão de queijo, então designada IMpq.

Análises microbiológicas da matéria-prima, produto intermediário, produto final e de acompanhamento da vida-de-prateleira do produto, simulando as condições de comercialização do alimento, foram realizadas em duas etapas, antes e após a introdução de medidas corretivas propostas e implantadas.

#### **4 Material e Métodos**

Tomando-se como base o fluxograma de produção adotado na IMpq, para a produção de pão de queijo, avaliaram-se, de acordo com a Portaria nº451, de 19 de setembro de 1997, SNVS/MS, a qualidade microbiológica de diferentes amostras de matéria-prima, o produto intermediário e o produto final (Figura 1 e Tabela 1).

Estes substratos, disponibilizados na IMpq, de acordo com vistorias de inspeção previamente conduzidas, apresentavam, então, variados pontos críticos de produção (Tabela 2).

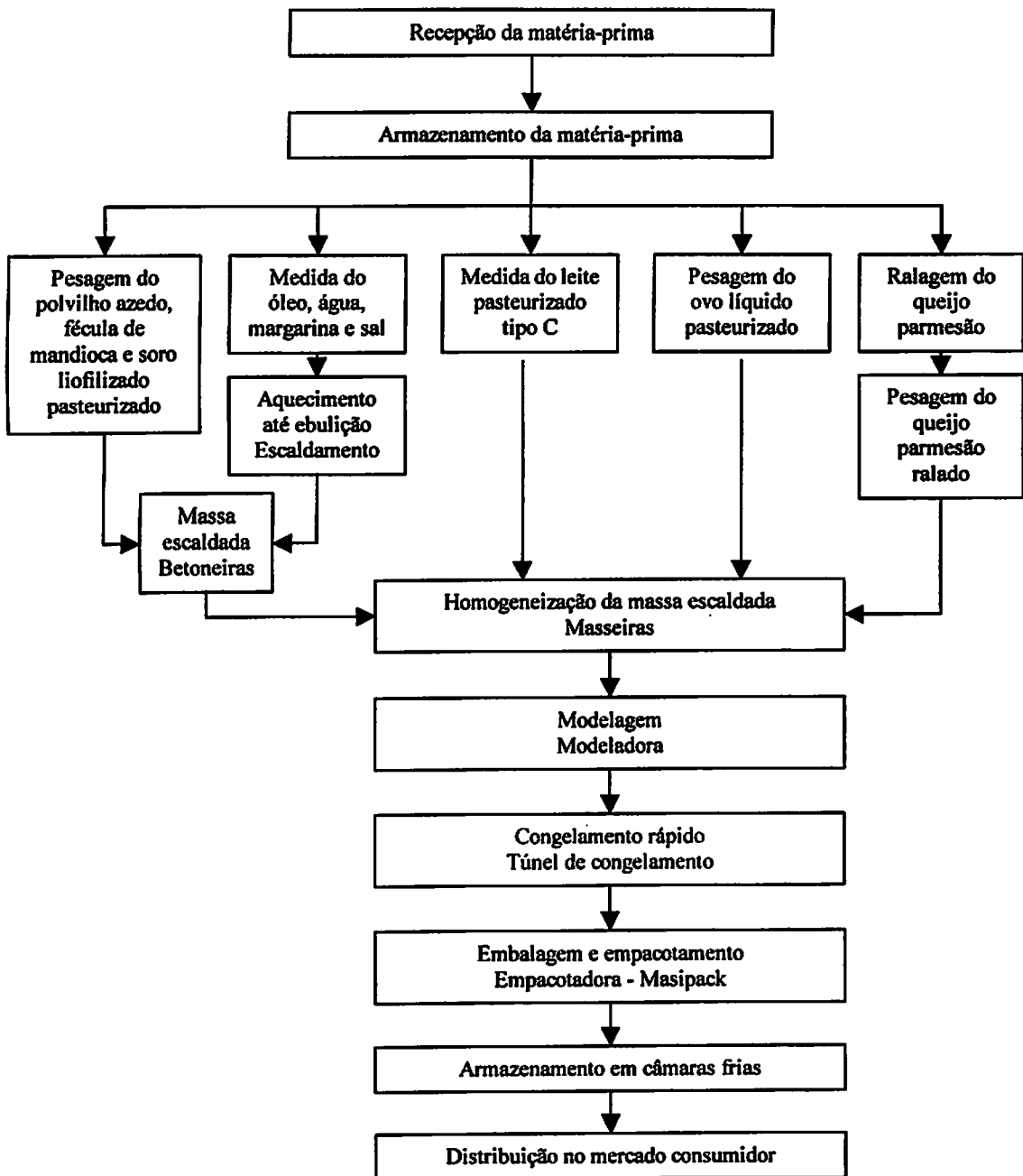


FIGURA 1 Modelo esquemático do fluxo de produção de pão de queijo adotado na IMPq

**TABELA 1** Amostras tomadas na IMpq para os procedimentos de monitoramento microbiológico realizado no período de junho a setembro de 2000

<b>Tipo de substrato/procedência</b>	<b>Local de coleta/Condições da amostra</b>
<b>Água tratada</b>	
Pias	Área de produção <sup>1</sup>
Bebedouro	“
Caixa d'água	Área externa
<b>Matéria-prima</b>	
Polvilho azedo	Área de estoque <sup>2</sup> /Embalagem original de papelão
Fécula de mandioca	“
Soro de leite pasteurizado	“
Queijo parmesão inteiro	No piso da câmara refrigerada/Sem embalagem
Queijo parmesão ralado	Área de produção/Recipientes plásticos
Ovo líquido pasteurizado	Câmara refrigerada/ Embalagem original de plástico
Leite pasteurizado tipo C	Câmara refrigerada/Embalagem original
<b>Produto intermediário</b>	
Massa esaladada	Área de produção/Betoneiras
Massa homogeneizada	Área de produção/Masseiras
Massa modelada	Área de produção/Modeladora
Massa modelada congelada	Área de produção/Túnel de congelamento
<b>Produto final</b>	
Massa congelada embalada	Área de produção/Embaladora "Masipack"

<sup>1</sup>IMpq: Indústria Mineira de pão de queijo; temperatura ambiente estimada em 28°C; temperatura estimada em 40°C; para cada substrato foram coletadas quatro amostras, analisadas em triplicata.

**TABELA 2 Principais pontos críticos de produção detectados após vistorias de inspeção previamente realizadas na IMpq, no período de junho a setembro de 2000**

<b>Itens avaliados</b>	<b>Falhas detectadas</b>
<b>Área de produção</b>	Higienização não era realizada com frequência Lixeiras, em número insuficiente, eram desprovidas de pedais para abertura O lixo não era removido com frequência Presença de sujidades retidas nos ralos Acúmulo de água no chão, após a higienização Ausência de pias, providas de sabão líquido e papel toalha, para higiene pessoal dos manipuladores
<b>Equipamentos e utensílios</b>	Higiene e sanificação não se realizavam diariamente Emprego de água fria nos procedimentos de limpeza Produtos de limpeza não adequados e armazenados incorretamente Ausência de um responsável para o acompanhamento da higiene e sanificação
<b>Manipuladores</b>	Hábito da lavagem de mãos não era adotado com a devida frequência Não tomavam banho ao chegar à indústria Quando portando lesões ou supurações de pele, não eram remanejados Portavam uniformes fora da área de produção Mantinhavam seus objetos particulares junto aos uniformes Debicavam, por vezes, de matéria-prima e outros ingredientes Não portavam luvas e máscara
<b>Matéria-prima</b>	Inexistência de laudos de análise de validação microbiológica Não respeito às datas de validade estabelecidas pelos fornecedores Temperatura de chegada dos produtos perecíveis não era observada O armazenamento não seguia as recomendações do fornecedor Embalagens da matéria-prima não eram higienizadas antes de sua utilização Ausência de planejamento racional para a pesagem e uso da matéria-prima
<b>Processamento</b>	A massa escaldada era mantida destampada até a homogeneização Produto intermediário permanecia à temperatura ambiente Reaproveitamento de pão-de-queijo recolhido do mercado
<b>Outros</b>	O produto final era colocado no mercado portando rótulo com dizeres incorretos e desprovidos de referência de lote

IMpq: Indústria Mineira de pão de queijo; Capítulo 2, p. 31-4

#### **4.1 Coleta e preparo das amostras**

A coleta da água tratada, aproximadamente 90mL, foi realizada em frascos estéreis contendo tiosulfato de sódio a 10%.

Já para a matéria-prima, produto intermediário e produto final, cerca de 225g ou 225mL foram amostrados, de modo individualizado, em frascos estéreis de 250g.

Uma vez coletadas, as amostras foram transferidas em condições isotérmicas ao Laboratório<sup>3</sup>, onde foram analisadas em tempo não superior a 2h.

Para cada substrato alimentício, 25g ou 25mL foram assepticamente pesados e homogeneizados em “Stomacher” com 225mL de Água Peptonada Tamponada, APT, e então preparadas diluições seriadas até 1/1000 em porções de 90mL do mesmo diluente. Quanto às amostras de água tratada, estas foram diluídas até 1/100 também em APT. A partir desta etapa, foram procedidas determinações bacteriológicas específicas para cada tipo de substrato alimentício (Brasil, 1997).

#### **4.2 Água tratada**

Amostras foram analisadas tomando-se como referência as normas de padrões de potabilidade de águas destinadas ao consumo humano.

##### **4.2.1 Determinação do Número Mais Provável (NMP) de coliformes totais e fecais (NMP), segundo Vanderzant & Splittstoesser (1992)**

Utilizou-se o método de fermentação de lactose em tubos múltiplos em que foram inoculados 1mL da amostra e 1mL das diluições 10, 1 e 0,1mL, em três séries de três tubos contendo CLS e CLD.

---

<sup>3</sup>Setor de Anaeróbios e Epidemiologia Molecular da Divisão de Bromatologia, Toxicologia e Medicamentos (DBTM), Instituto Octávio Magalhães (IOM), Fundação Ezequiel Dias (FUNED); Rua Conde Pereira Carneiro, 80 Bairro Gameleira 30510-010 Belo Horizonte, MG laem@funed.mg.gov.br

Após incubação a 35°C durante 48 horas, os tubos presuntivamente positivos, que evidenciaram produção de gases nos tubos de Duhram, foram submetidos ao teste confirmatório para enumeração de coliformes totais e fecais, para os primeiros utilizando-se CVB, e para os segundos, caldo EC, com incubação até 48h, em estufa a 35°C, e em banho-maria a 44,5°C, respectivamente.

Resultados de densidade de coliformes totais e coliformes fecais foram expressos em NMP/100mL da amostra analisada.

#### **4.2.2 Enumeração de bactérias aeróbias mesófilas, segundo Vanderzant & Splittstoesser (1992)**

Inocularam-se, em duplicata, 1mL da amostra e 1mL da diluição 1/10 em placas de Petri, com incorporação de PCA previamente fundido e estabilizado em banho-maria a 44-46°C. Após homogeneização e solidificação, as placas foram incubadas a 35°C durante 48 horas. Multiplicando-se a média das contagens de colônias pelo fator de diluição utilizado, os resultados foram expressos como UFC/mL da amostra.

#### **4.3 Matéria-prima**

As amostras foram analisadas tomando-se como referência as normas de padrões da Secretaria da Vigilância Sanitária de Belo Horizonte, através da portaria nº 451, de 19 de setembro de 1997, conforme se observa na Tabela 3.

TABELA 3 Análises microbiológicas das matérias-primas utilizadas na produção do pão de queijo

Amostras	Colif totat	Colif fecal	Bact. aerob. mesóf.	S.aureus	Bolores e leveduras	Salmonela	Clostrídios sulfitos redutores	B. cereus
Polvilho		•		•	•	•		•
Fécula		•		•	•	•		•
Soro	•	•	•	•	•	•	•	•
Leite	•	•	•			•		
Ovo cru						•		
Ovo líquido		•	•	•		•		
Queijo inteiro		•		•		•		
Queijo ralado		•		•		•		

•Análises microbiológicas realizadas segundo a Secretaria de Vigilância Sanitária através da Portaria nº 451, de 19 de setembro de 1997

#### 4.3.1 Metodologia microbiológica

##### 4.3.1.1 Enumeração de *Bacillus cereus*

Inoculou-se, com auxílio de alça de Drigalski, sobre superfície de BC, 0,1mL das diluições 1/10, 1/100 e 1/1000. Após completa incorporação, as placas inoculadas foram incubadas a 30°C até 24h.

Colônias suspeitas de *B.cereus*, róseas, com halo branco e convexas, foram presuntivamente contadas e cerca de 1% destas foi inoculado em ágar nutriente inclinado e submetido ao teste de coloração de Gram. Esfregaços foram examinados ao microscópio para confirmação da presença de bastonetes longos e Gram positivos, dispostos em cadeias e apresentando esporos não deformantes. Culturas assim caracterizadas foram submetidas à confirmação bioquímica através da produção de ácido em anaerobiose, em caldo glicose-vermelho de fenol; produção de acetilmetilcarbinol, em caldo VP; decomposição de tirosina, em ágar tirosina, e crescimento em presença de 0,001% de lisozima.

Resultados foram expressos em UFC/g da amostra (Vanderzant & Splittstoesser, 1992; Food and Drug Administration, 1992).



#### **4.3.1.2 Enumeração de bactérias aeróbias mesófilas, segundo Vanderzant & Splittstoesser (1992)**

Inocularam-se, em duplicata, 1mL da amostra e 1mL das diluições 1/10, 1/100 e 1/1000 em placas de Petri com incorporação de PCA, previamente fundido e estabilizado em banho-maria a 44-46°C. Após homogeneização e solidificação, as placas foram incubadas a 35°C durante 48 horas. Multiplicando-se a média das contagens de colônias pelo fator de diluição utilizado, os resultados foram expressos como UFC/mL da amostra.

#### **4.3.1.3 Enumeração de bolores e leveduras segundo Vanderzant & Splittstoesser (1992)**

Semearam-se, em duplicata, alíquotas de 1mL das diluições 1/10, 1/100 e 1/1000, quando necessárias, em placas de Petri às quais havia sido acrescido 0,2mL de ácido tartárico a 10%. Adicionaram-se 15mL de ágar AB, previamente fundido e estabilizado em banho-maria a 44-46°C. Após homogeneização e solidificação, as placas foram incubadas a 25°C durante cinco dias. Multiplicando-se a média das contagens de colônias pelo fator de diluição utilizado, os resultados foram expressos como UFC/g da amostra.

#### **4.3.1.4 Determinação do Número Mais Provável (NMP) de coliformes totais e fecais, segundo Vanderzant & Splittstoesser (1992)**

Utilizou-se o método de fermentação de lactose em tubos múltiplos, em que foi inoculado 1mL das diluições 1/10, 1/100 e 1/1000 em três séries de três tubos contendo LST.

Após incubação a 35°C durante 48 horas, os tubos presuntivamente positivos, que evidenciaram produção de gases nos tubos de Durham, foram submetidos ao teste confirmatório para enumeração de coliformes totais e fecais, para os primeiros utilizando-se CVB simples, e para os segundos, caldo EC, com

incubação até 48h, em estufa a 35°C, e, em banho-maria a 44,5°C, respectivamente.

Resultados de densidade de coliformes totais e fecais foram expressos em NMP/g da amostra analisada.

#### **4.3.1.5 Enumeração de clostrídios sulfitos redutores**

Inoculou-se, por incorporação, 1mL das diluições 1/10 e 1/100, em duplicata, em placas de Petri com ágar “SPS”. Após incubação a 46°C durante 48h, em sistema de anaerobiose “Gas Pack”, bioMérieux, contaram-se colônias negras, que foram transferidas para caldo “BHI”, incubadas a 37°C por 24h e, posteriormente, submetidas ao teste de coloração de Gram. Esfregaços foram examinados ao microscópio para confirmação da presença de bastonetes Gram positivos esporulados ou não. Resultados foram expressos em UFC de clostrídios sulfito redutores/g da amostra.

#### **4.3.1.6 Enumeração de estafilococos produtores de coagulase, segundo Vanderzant & Splittstoesser (1992)**

Inoculou-se, com auxílio de alça de Drigalski, sobre superfície de ágar BP, 0,1mL das diluições 1/10, 1/100 e 1/1000.

Após completa incorporação, as placas inoculadas foram incubadas a 37°C durante 48horas. Decorrido o período de incubação, procedeu-se à contagem das placas anotando-se, separadamente, resultados para colônias típicas e atípicas. Colônias típicas, de coloração negra, puntiformes e circundadas por um halo branco opaco e outro, mais externo, transparente; e colônias atípicas, cinzentas, mucóides e desprovidas de halo e negras, com apenas um halo, foram pescadas. Teste de produção de coagulase foi realizado com cerca de 2% das colônias, sendo considerados como positivos tubos com coágulo 4+. Os resultados foram expressos em UFC de estafilococos produtores de coagulase/g da amostra.

#### 4.3.1.7 Pesquisa de *Listeria monocytogenes*

Para o pré-enriquecimento, foram pesados e homogeneizados, em “Stomacker”, 25g da amostra em 225mL de APT, com incubação a 35°C durante 24 horas. Foi transferido, então, 0,1mL do crescimento obtido para caldo “LEB”, incubando-se a 37°C durante 24h (Van Leusen, 1982; Lovett, 1988; Bush & Donnelly, 1992; Vanderzant & Splitstoesser, 1992). Para isolamento diferencial, o material foi semeado, por esgotamento com alça de níquel-cromo, para ágar Palcam e ágar Oxford, seguindo incubação a 35°C pelo período de até 48h.

Para a contagem adotou-se o seguinte perfil de colônias: pequenas; puntiformes; arredondadas; contra a luz, apresentando cor esverdeada; quando do início da hidrólise da esculina, atingindo, posteriormente, tons esbranquiçados, para o ágar Palcam. No que diz respeito ao ágar Oxford, foram selecionadas aquelas que apresentaram tamanho médio; arredondadas, na cor branca leitosa, que passa a marrom brilhante e transparente, quando da luz incidente.

Identificação bioquímica de linhagens compatíveis ao gênero *Listeria* foi, após crescimento de 24h a 35°C em caldo “BHI”, foi conduzida através de repiques por estrias com auxílio de alça de níquel-cromo, em “TSA” enriquecido com 6% de extrato de levedura. Após incubação a 35°C por 24h, linhagens foram avaliadas, através da ação de luz incidente, quanto à presença da tonalidade cinza-azulada. A partir das colônias assim caracterizadas, realizaram-se testes de coloração de Gram; motilidade a 25°C, em ágar “SIM”, lise de hemácias em placas de “TSA” suplementado com sangue de carneiro a 5%; “CAMP test” utilizando culturas de *Rodococcus equi* e *S.aureus*, produtor de “SEH”, e fermentação dos carboidratos xilose e manitol (Rocourt, 1989). Além destes, utilizaram-se também os Sistemas Api *Listeria*, bioMérieux, Craonne, France, para ampliação de respostas bioquímicas.

Linhas então bioquimicamente caracterizadas como pertencentes ao gênero *Listeria* foram encaminhadas para análise sorológica em Laboratório de Referência<sup>4</sup>. A classificação antigênica em sorogrupo/sorovar foi realizada por soroaglutinação em lâmina utilizando antissoros policlonais adsorvidos para fatores somáticos e flagelares (Seeliger & Jones, 1986).

#### 4.3.1.8 Pesquisa de *Salmonella* sp.

Para o pré-enriquecimento, foram pesados e homogeneizados, em "Stomacher", 25g da amostra em 225mL de APT, com incubação a 35°C durante 24 horas (Van Leusen *et al.* 1982). Foi transferido 0,1mL do crescimento obtido para caldo de Rappaport-Vassiliadis, segundo Van Schothorst & Renaud (1983). Após incubação deste a 37°C por 24 horas, com auxílio de alça de níquel-cromo, procederam-se sementeiras por estrias em ágar SS e ágar de Hecktoen, com incubação a 35°C, durante 24 horas (International Commission on Microbiological Specifications for Foods, 1992; Food and Drug Administration. Bacteriological Analytical Manual, 1992; Vanderzant & Splittstoesser, 1992).

Colônias não fermentadoras de lactose, suspeitas de *Salmonella*, foram repicadas para o ágar IAL e, posteriormente, submetidas à classificação antigênica em sorogrupo/sorovar, através de soroaglutinação em lâmina utilizando anti-soros policlonais adsorvidos para fatores somáticos e flagelares<sup>5</sup>.

#### 4.4 Produto intermediário e final

Não existindo parâmetros microbiológicos legais que regulamentem o pão de queijo no decorrer de seu processamento, isto é, a massa do pão de queijo

---

<sup>4</sup>Laboratório de Bacteriologia, Instituto Oswaldo Cruz, FIOCRUZ, Rio de Janeiro, RJ

<sup>5</sup>Análise sorológica realizada no Setor de Microbiologia, Divisão de Biologia Médica (DBM), Instituto Octávio Magalhães (IOM), Fundação Ezequiel Dias (FUNED); Rua Conde Pereira Carneiro, 80 -Bairro Gameleira- 30510-010 Belo Horizonte, MG -lammed@funed.mg.gov.br

nas fases de escaldamento, nas betoneiras; homogeneização, nas masseiras; modelagem, na modeladora; e congelamento, na saída do túnel de congelamento, adotaram-se, para estes produtos intermediários, os mesmos parâmetros que regulamentam o pão de queijo propriamente dito (Brasil, 1997).

Foram então realizadas análises microbiológicas para a determinação do Número Mais Provável (NMP) de coliformes fecais, a enumeração de estafilococos produtores de coagulase e clostrídios sulfitos redutores. Tomou-se como substrato para estas análises a massa de pão de queijo escaldada, homogeneizada, modelada e congelada, e ainda, o pão de queijo congelado e embalado pronto para a distribuição no mercado consumidor.

Em se considerando a confirmação dos pontos críticos de produção, através da evidência de resultados analíticos indicativos da má qualidade microbiológica dos itens então pesquisados, a correção destes seria procedida, aplicada e acompanhada.

Para tal, novas análises microbiológicas, por um período de três semanas consecutivas, seriam realizadas conforme já descrito no item 4.3.1.

Além dos mesmos itens pesquisados, seria adotada, ainda, a análise microbiológica do produto final, simulando em Laboratório, após acondicionamento em refrigerador a  $-4^{\circ}\text{C}$ , as condições ideais de venda do pão-de-queijo no comércio.

Estas últimas análises, realizadas em períodos de 30, 60, 90, 120, 150 e 180 dias, poderiam vir a estimar a vida-de-prateleira do pão-de-queijo produzido na IMPq.

## 5 Resultados e Discussão

Os resultados microbiológicos apresentados na primeira etapa evidenciaram a compatibilização de todas as amostras de água tratada, polvilho de mandioca, ovo líquido pasteurizado e massa escaldada aos padrões legais vigentes, dados não apresentados em tabelas (Brasil, 1997).

As amostras de fécula de mandioca mostraram-se dentro do estabelecido por lei no que tange à contagem de coliformes fecais, estafilococos produtores de coagulase, bolores e leveduras e quanto à presença de *Salmonella* sp. Todavia, duas amostras, Ref. 2 e 3, apresentaram-se contaminadas com *B.cereus*, de acordo com valores  $>1,0 \times 10^3$  UFC/g (Tabela 4).

Contagens elevadas deste patógeno, de acordo com Azeredo (1996), são comuns em féculas e outros amiláceos, sobretudo quando o estoque ou armazenagem expõe o produto à umidade, e ainda quando em temperaturas elevadas. Esta situação contributiva foi verificada na estocagem da fécula então analisada, que, indevidamente, era mantida em local que apresentava, por ocasião da coleta, cerca de 40°C.

TABELA 4 Resultados de análise microbiológica de fécula de mandioca disponibilizada na IMPq

Amostras <sup>1</sup> (Ref.)	Coliformes fecais (NMP/g)	Bolores e leveduras (UFC/g)	<i>B.cereus</i> (UFC/g)
1	0	Nr	$1,0 \times 10^3$
2	0	$1,0 \times 10^4$	$1,0 \times 10^4$
3	11,40	$1,2 \times 10^3$	$2,0 \times 10^4$
4	0	$5,0 \times 10^2$	$3,0 \times 10^3$

IMPq: Indústria Mineira de pão de queijo; <sup>1</sup>amostras, de mesmo lote e mesma marca, tomadas ao acaso; Nr: Não realizado; valores médios de análises realizadas em triplicata, segundo padrões legais vigentes; (Brasil, 1997); *Salmonella* sp.: ausente em 25g de amostra; estafilococos produtores de coagulase:  $<100$ UFC/g; NMP/g: Número Mais Provável; UFC/g: Unidade Formadora de Colônias

No que diz respeito ao leite pasteurizado tipo C, todas as quatro amostras analisadas apresentaram índice condenatório de coliformes totais, valor maior que 10NMP/mL, e duas, além destas, também evidenciaram coliformes fecais e bactérias aeróbias mesófilas, conforme valores superiores a 2NMP/mL e  $3,0 \times 10^5$ UFC/mL, respectivamente (Tabela 5).

Apesar de o leite pasteurizado tipo C ter sido armazenado e mantido em condições de refrigeração, seu prazo de validade não era obedecido, podendo esta situação ter contribuído para a elevação da microbiota presente.

TABELA 5 Resultados de análise microbiológica do leite pasteurizado tipo C disponibilizado na IMPq

Amostras (Ref.)	Coliformes totais (NMP/mL)	Coliformes fecais (NMP/mL)	Bactérias aeróbias mesófilas (UFC/mL)
1	$2,3 \times 10$	0	$1,3 \times 10^3$
2	$1,4 \times 10$	0	$3,5 \times 10^3$
3	$1,1 \times 10^3$	$1,1 \times 10^3$	$2,8 \times 10^6$
4	$1,1 \times 10^3$	93,3	$3,0 \times 10^6$

IMPq: Indústria Mineira de pão de queijo; <sup>1</sup>amostras, de mesmo lote e mesma marca, tomadas ao acaso; Valores médios de análises realizadas em triplicata, segundo padrões legais vigentes (Brasil, 1997); *Salmonella* sp.: ausente em 25g de amostra; NMP/g: Número Mais Provável; UFC/g: Unidade Formadora de Colônias

São conhecidos, todavia, apesar de não esperados, problemas com a qualidade microbiológica envolvendo leite pasteurizado tipo C.

De acordo com relatos de Vieira *et al.* (2001) e Padilha & Fernandes (1999), este produto foi, recentemente, fiscalizado nos Estados de Goiás e Pernambuco e condenado por elevadas contagens de coliformes fecais e bactérias aeróbias mesófilas.

Trabalho realizado por Pinto (2001), quando da realização de pesquisa em indústrias de pão-de-queijo localizadas em Belo Horizonte, MG, observou

que 17% das amostras do leite pasteurizado tipo C empregado no fabrico do produto lácteo mostravam-se igualmente fora dos padrões quanto à contagem destes dois grupos de microrganismos.

Quanto aos dados encontrados para soro liofilizado de leite pasteurizado, a amostra de Ref. 2 mostrou-se fora dos padrões quanto às contagens de coliformes totais, valor  $>10\text{NMP/g}$ , coliformes fecais,  $>1\text{NMP/g}$ ; e bactérias aeróbias mesófilas,  $>5,0 \times 10^4\text{UFC/g}$ , respectivamente, e a amostra de Ref. 3 quanto aos coliformes fecais e bactérias aeróbias mesófilas (Tabela 6).

**TABELA 6** Resultados de análises microbiológicas do soro liofilizado de leite pasteurizado disponibilizado na IMPq

Amostras (Ref.)	Coliformes totais (NMP/g)	Coliformes fecais (NMP/g)	Bactérias aeróbias mesófilas (UFC/g)	Bolores e leveduras (UFC/g)	<i>B.cereus</i> (UFC/g)
1	0	0	$8,0 \times 10^3$	$3,0 \times 10^3$	NHC
2	$3,3 \times 10^3$	4,5	$5,2 \times 10^5$	$4,0 \times 10^3$	NHC
3	4,0	4,0	$1,3 \times 10^5$	$1,5 \times 10^3$	NHC
4	0	0	$1,7 \times 10^3$	$5,0 \times 10^3$	$1,0 \times 10^2$

IMPq: Indústria Mineira de pão de queijo; Amostras, de mesmo lote e mesma marca, tomadas ao acaso; Valores médios de análises realizadas em triplicata, segundo padrões legais vigentes, (Brasil, 1997); *Salmonella* sp.: ausente em 25g de amostra; Estafilococos produtores de coagulase:  $<100\text{UFC/g}$ ; NMP/g: Número Mais Provável; UFC/g: Unidade Formadora de Colônias

Apesar de duas amostras deste produto tiverem se mostrado não aceitáveis, as duas restantes apresentaram valores muito próximos aos limites estabelecidos. Mesmo em se tratando de substrato desidratado e proveniente de leite pasteurizado, sua armazenagem ocorria em condições de temperaturas muito elevadas, aproximadamente  $40^\circ\text{C}$ , o que pode, possivelmente, ter influenciado positivamente no desenvolvimento microbiano.



TABELA 7 Resultados de análise microbiológica do queijo parmesão, inteiro e ralado, disponibilizado na IMPq

Amostras de queijo parmesão (Ref.)	Coliformes fecais (NMP/g)	Estafilococos produtores de coagulase (UFC/g)	Bolores e leveduras (UFC/g)
<b>Produto inteiro</b>			
1	$1,1 \times 10^3$	$6,0 \times 10^4$	Nel
2	$4,6 \times 10^2$	$3,4 \times 10^6$	“
3	$4,6 \times 10^2$	$1,1 \times 10^5$	“
4	$1,1 \times 10^3$	$2,3 \times 10^4$	“
<b>Produto ralado</b>			
1	$4,3 \times 10^2$	$8,0 \times 10^4$	$1,0 \times 10^3$
2	0	<100	$1,5 \times 10^4$
3	93,3	$3,6 \times 10^3$	$1,9 \times 10^4$
4	$1,1 \times 10^3$	$2,0 \times 10^4$	$1,5 \times 10^6$

IMPq: Indústria Mineira de pão de queijo; Amostras, de mesmo lote e mesma marca, tomadas ao acaso; Valores médios de análises realizadas em triplicata, segundo padrões legais vigentes (Brasil, 1997); *Salmonella* sp.: ausente em 25g de amostra; NMP/g: Número Mais Provável; UFC/g: Unidade Formadora de Colônias; Nel: Não exigido por lei (Brasil, 1997)

O queijo parmesão inteiro apresentou-se contaminado com coliformes fecais,  $>5,0 \times 10^3$  NMP/g, e ainda evidenciou elevadas contagens de estafilococos produtores de coagulase em todas as amostras estudadas.

O índice tolerável por lei para este produto lácteo prevê valor igual a  $10^2$  UFC/g deste grupo de microrganismos (Tabela 7). Além disto, dentre estes distinguiu-se o *S.aureus*, responsável pela maioria das linhagens enterotoxigênicas, cuja população mínima capaz de provocar intoxicação está situada em faixas próximas a  $10^5$  UFC/g (Bergdoll, 1989).

No que diz respeito ao queijo parmesão ralado, para o qual existe ainda a exigência de contagem de bolores e leveduras, foi observado, para três das amostras pesquisadas, Ref. 2, 3 e 4, valor  $>5,0 \times 10^3$  UFC/g de estafilococos (Tabela 7).

Este grupo de microrganismos, dentre outros, reflete, no produto analisado, as condições de acondicionamento ou manutenção inadequados, o que se confirma neste caso, uma vez que, após ralagem, o queijo permanecia à temperatura ambiente, em recipientes plásticos desprovidos de tampa.

Quanto à enumeração de coliformes fecais e estafilococos produtores de coagulase, amostras de Ref. 1, 3 e 4 apresentaram-se fora dos padrões,  $5,0 \times 10^6$  UFC/g e  $10^3$  UFC/g, respectivamente.

Estes valores, mesmo condenatórios, inferiores àqueles verificados para amostras do queijo inteiro, refletem, apesar do estreito contato com manipuladores, a realidade de o maior grau de contaminação microbiana encontrar-se localizado na casca ou na superfície externa.

Estudos conduzidos sobre a qualidade do queijo no Estado de Minas Gerais têm reportado sobre a contaminação com bactérias do grupo coliformes fecais e, principalmente, com *S.aureus.*, para este último citando-se, com ênfase, seu envolvimento em alguns episódios de intoxicação alimentar (Sabioni *et al.* 1988; Pereira *et al.* 1991; Carmo *et al.* 1996).

De acordo com os resultados apresentados na Tabela 8, amostras de massa procedentes das betoneiras mostraram-se em boas condições microbiológicas no que tange à enumeração de coliformes fecais, estafilococos produtores de coagulase, clostrídios sulfitos redutores e pesquisa de *Salmonella* sp.

Possivelmente em virtude da temperatura elevada do escaldamento com solução fervente de água, óleo de soja, margarina e sal então utilizada, deve ter ocorrido, provavelmente, um efeito deletério sobre a microbiota presente, neste caso proveniente sobretudo da fécula de mandioca e do soro liofilizado de leite pasteurizado, o que se constatou anteriormente, conforme já apresentado nas Tabelas 3 e 5.

Por sua vez, em todas as quatro amostras de massa homogeneizada foi detectado o mesmo grupo de estafilococos, e para a massa modelada, verificaram-se, além deste, também coliformes fecais em duas amostras, cujas referências são 1 e 2.

Estes dados de contaminação do produto intermediário são similares àqueles relatados por Pinto (2001), que observou, em indústrias de pão de queijo localizadas em Belo Horizonte, MG, a contaminação elevada por coliformes fecais e estafilococos coagulase positivos.

Já os resultados evidenciados quando da análise da massa modelada congelada, logo após sua saída do túnel de congelamento, em temperatura controlada a  $-25^{\circ}\text{C}$ , apresentaram decréscimo tanto na população de estafilococos não produtores de coagulase como de coliformes fecais (Tabela 8).

Esta temperatura de  $-25^{\circ}\text{C}$  pode ter, caso não completamente eliminado, provocado danos celulares aos microrganismos presentes, os quais, uma vez injuriados pelas condições de frio, passaram a não se expressar sob a forma de colônias, não podendo, portanto, de acordo com técnicas metodológicas usuais empregadas, ser detectados (Busta, 1976).

Ao confrontar estes últimos dados com aqueles reportados para o produto final, massa congelada e empacotada (Tabela 9), pode-se estimar que, uma vez cessada a aplicação da temperatura de  $-25^{\circ}\text{C}$  do túnel de congelamento, ocorreu alteração na densidade populacional, sobretudo do grupo de estafilococos produtores de coagulase.

**TABELA 8** Resultados de análise microbiológica do produto intermediário disponibilizado na IMpq

Amostras de produto intermediário/ Equipamento (Ref.)	Coliformes fecais (NMP/g)	Estafilococos produtores de coagulase (UFC/g)
<b>Massa esaldada/ Betoneiras</b>		
1	3,0	<100
2	4,3 x 10	<100
3	0	<100
4	0	<100
<b>Massa homogeneizada/ Masseiras</b>		
1	3,6	1,7 x 10 <sup>4</sup>
2	0	1,1 x 10 <sup>5</sup>
3	3,6 x 10	2,0 x 10 <sup>5</sup>
4	0	2,0 x 10 <sup>5</sup>
<b>Massa modelada/ Modeladora</b>		
1	0	1,0 x 10 <sup>5</sup>
2	0	6,0 x 10 <sup>4</sup>
3	9,3 x 10 <sup>3</sup>	3,3 x 10 <sup>4</sup>
4	1,7 x 10 <sup>3</sup>	1,0 x 10 <sup>4</sup>
<b>Massa modelada congelada/ Túnel de congelamento</b>		
	3,0	1,0 x 10 <sup>3</sup>
1	9,3 x 10	1,0 x 10 <sup>3</sup>
2	9,3 x 10	1,0 x 10 <sup>3</sup>
3	2,3 x 10	1,0 x 10 <sup>3</sup>
4		

IMpq: Indústria Mineira de pão de queijo; <sup>1</sup>amostras, tomadas ao acaso, coletadas em um mesmo fluxo/dia de produção; Valores médios de análises realizadas em triplicata, segundo padrões legais vigentes (Brasil, 1997); *Salmonella* sp.: ausente em 25g de amostra; Clostrídios sulfito redutores: <100UFC/g; NMP/g: Número Mais Provável; UFC/g: Unidade Formadora de Colônias

TABELA 9 Resultados de análise microbiológica do produto final disponibilizado na IMPq

Amostras (Ref.)	Coliformes fecais (NMP/g)	Estafilococos produtores de coagulase (UFC/g)
1	$3,6 \times 10$	$3,0 \times 10^3$
2	$2,1 \times 10$	$1,2 \times 10^5$
3	$4,2 \times 10$	$3,0 \times 10^4$
4	$1,1 \times 10^3$	$5,0 \times 10^4$

IMPq: Indústria Mineira de pão de queijo; <sup>1</sup>Amostras, tomadas ao acaso, coletadas em um mesmo fluxo/dia de produção; Valores médios de análises realizadas em triplicata, segundo padrões legais vigentes (Brasil, 1997); *Salmonella* sp.: ausente em 25g de amostra; Clostrídios sulfito redutores: <100UFC/g; NMP/g: Número Mais Provável; UFC/g: Unidade Formadora de Colônias

Estes microrganismos apresentaram um acréscimo de um e dois ciclos log, respectivamente, para as amostras de Ref. 3 e 4 e Ref. 2, variando de  $10^3$  para  $10^4$  e  $10^5$ UFC/g, respectivamente, conforme se observa na Tabela 8.

Avaliação sobre a qualidade microbiológica de quinze marcas de pão de queijo comercializadas em Belo Horizonte, MG, foi realizada por Dias *et al.* 1995. Os autores observaram, dentre 60 unidades do produto, que 68,3% das amostras estudadas encontravam-se em discordância com os padrões legais vigentes (Brasil, 1997). Sobretudo coliformes fecais e estafilococos produtores de coagulase foram detectados, e ainda *Salmonella* sp. em 3,3% destas.

De acordo com os dados anteriormente relatados, pôde-se confirmar microbiologicamente, tanto para quatro das matérias-primas como para dois dos produtos intermediários e produto final, a inadequação das práticas de fabricação adotadas na IMPq.

Desta maneira, foram introduzidas e acompanhadas as modificações e correções da prática então adotada, de acordo com o proposto na Tabela 10, para, em seguida, serem realizadas nova amostragem e análise microbiológica, por três semanas consecutivas, dos mesmos itens estudados.

**TABELA 10** Medidas propostas e implantadas com vistas à correção dos pontos críticos de controle detectados na IMPq

<b>Itens considerados</b>	<b>Medidas corretivas propostas e implantadas</b>
<b>Área de produção</b>	Higienização contínua e fiscalizada Lixeiras em número suficiente e providas de pedais para abertura Remoção diária do lixo Uso de rodos para eliminação da água empoçada Pias providas de sabão líquido e papel toalha para higiene pessoal dos manipuladores
<b>Higiene de equipamentos e utensílios</b>	Limpeza diária ao final do expediente Adoção de água quente no procedimento de higiene e sanificação Local adequado para a armazenagem dos produtos de limpeza Designação de um gerente para fiscalização da limpeza Palestra sobre a utilização correta de produtos de limpeza
<b>Manipuladores</b>	Correta e freqüente higienização das mãos Obrigatoriedade de banho ao chegar à indústria Remanejamento de manipuladores portando lesões ou supurações da pele e mucosas Proibição do uso de uniforme fora da área de produção Proibição da permanência de objetos particulares junto ao uniforme Proibição da alimentação dentro da área de produção Obrigatoriedade do uso de luvas e máscara
<b>Matéria-prima</b>	Obediência às datas de validade Conferência das temperaturas de chegada da matéria-prima perecível Armazenamento de acordo com as recomendações do fornecedor Conferência das condições de todas as embalagens Higienização de embalagens antes de sua utilização Mudança de marca e fornecedor ou fervura do leite tipo C Higienização do queijo parmesão inteiro, através de raspagem e lavagem, antes de sua utilização Planejamento e programação para correta abertura e pesagem
<b>Processamento</b>	Manutenção do produto intermediário em câmaras frias até o momento de sua utilização Obediência ao fluxo de produção, de forma a evitar contaminação cruzada Proibição do reaproveitamento de pão-de-queijo no comércio
<b>Outros</b>	Modificação nos dizeres do rótulo de forma a apresentar ingredientes corretos e com referência ao nº de lote

IMPq: Indústria Mineira de pão de queijo

Nesta segunda etapa, os resultados observados para a fécula de mandioca, após a racionalização de seu uso, que consistiu sobretudo na redução de tempo de estoque e armazenagem em área apropriada, reservada, provida de ventilação e temperatura ambiente apresentaram, novo perfil microbiológico.

Ausência de coliformes fecais e redução na contagem de bolores e leveduras e *B.cereus*, da ordem de três ciclos log, compatibilizou-a com os padrões legais vigentes.

Quanto ao leite pasteurizado tipo C, uma vez não tendo sido possível a busca de outro produto, de marca e fornecedor distintos, recomendou-se seu aquecimento, fervura durante 5min., em recipiente inox.

Os resultados observados após este tratamento térmico indicaram a eficiência do tratamento, quanto à ausência de coliformes totais e fecais e à contagem de <10UFC/mL para bactérias aeróbias mesófilas.

Igualmente, foram observados para soro liofilizado de leite pasteurizado, após sua transferência para a câmara fria, os mesmos resultados obtidos para o leite pasteurizado tipo C, além da redução das contagens de *B.cereus* e bolores e leveduras para  $10^2$  e <100UFC/g, respectivamente.

No que concerne às amostras de queijo parmesão, as medidas corretivas propostas e implantadas embasaram-se no uso de luvas e máscara para os manipuladores e a correta higienização da máquina de ralagem.

Em se tratando do queijo parmesão utilizado na IMPq de produto comercializado sem SIF, isento de qualquer envoltório externo que o embalasse e até então disposto diretamente por sobre o piso da câmara fria, ainda mais estas condições contribuíam para sua contaminação.

TABELA 11 Resultados de análise microbiológica do queijo parmesão, inteiro e ralado disponibilizado na IMPq<sup>1</sup>, após introdução de medidas corretivas<sup>234</sup>

Amostras de queijo parmesão <sup>5</sup> (Ref.)	Coliformes fecais (NMP/g)	Estafilococos produtores de coagulase (UFC/g)	Bolores e leveduras (UFC/g)
<b>Produto inteiro</b>			
1	0	<100	Nel
2	3,57	<100	“
3	11,4	2,0 X 10 <sup>3</sup>	“
<b>Produto ralado</b>			
1	3,57	<100	<100
2	9,18	<100	1,5 x 10 <sup>2</sup>
3	11,4	2,7 x 10 <sup>3</sup>	<100

<sup>1</sup>IMPq: Indústria Mineira de pão de queijo; <sup>2</sup>Raspagem da superfície externa com auxílio de faca seguida de lavagem, imersão em água com hipoclorito de sódio 0,5% e enxágüe em água corrente; <sup>3</sup>correta higienização com água aquecida, aplicação de detergente sanitizante, seguida de enxágüe e borrifamento com solução de hipoclorito a 1%; <sup>4</sup>manipuladores portando luvas e máscara, quando da higienização e ralagem do queijo; <sup>5</sup>amostras, de mesmo lote e mesma marca, tomadas ao acaso; valores médios de análises realizadas em triplicata, segundo padrões legais vigentes; (Brasil, 1997); *Salmonella* sp.: ausente em 25g de amostra; NMP/g: Número Mais Provável; UFC/g: Unidade Formadora de Colônias; Nel: Não exigido por lei (Brasil, 1997)

Assim, adotaram-se, logo após sua raspagem, lavagem, secagem em toalhas de papel, recobrimento com sacos plásticos de primeiro uso e transferência para estrados de poliestireno localizados no interior da câmara fria.

O procedimento de raspagem, com auxílio de faca, em cerca de 2cm da superfície externa, e posterior imersão do produto em água com hipoclorito de sódio a 0,5%, por um período estimado de 15min., seguido de enxágüe em água corrente, consistiu em estratégia alternativa e eficiente, contribuindo para o controle da contaminação então observada para o produto (Tabela 11).

A recomendação da raspagem da casca do queijo, tem sido adotada nos países europeus, visando o controle de *L.monocytogenes* neste produto lácteo, sobretudo em função de pessoas pertencentes ao grupo de risco, como mulheres



grávidas, imunodeprimidos e transplantados renais, dentre outros (Rocourt, 1995).

A melhoria da qualidade obtida para a matéria-prima, fécula de mandioca, leite pasteurizado tipo C, soro liofilizado de leite pasteurizado e queijo parmesão, aliada às Boas Práticas de Fabricação introduzidas, vieram a determinar, conseqüentemente, a melhoria da qualidade microbiológica. Esta qualidade foi confirmada para todos os produtos intermediários, para o produto final, ficando igualmente assegurada a validade do pão de queijo, no período avaliado em até 180 dias de vida-de-prateleira .

De acordo com os resultados obtidos nesta experimentação de monitoramento microbiológico da IMpq, foi constatada a possibilidade da obtenção de um produto de qualidade microbiológica compatível com as normas de regulamentação.

- PEREIRA, M.L.; LARA, M.A.; DIAS, R.S.; CARMO, L.S. Intoxicação por *Staphylococcus aureus* provocada por queijo "Tipo Minas". *Revista de Microbiologia*, v.22, n.4, p.349-50, out/dez. 1991.
- PINTO, R.G. Avaliação das boas práticas de fabricação e da qualidade microbiológica na produção de pão-de-queijo. 2001. 181p. Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimento) – Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.
- ROCOURT, J. La listeriose 1985-1995: Aspects microbiologiques et épidémiologiques. *Bulletin de L'Academie Nationale de Medicine*, Paris, v.179, n.8, p.1613-14, Nov. 1995.
- SABIONI, J.G.; HIROOKA, E.Y.; SOUZA, M.L.R. Intoxicação alimentar por queijo Minas contaminado com *Staphylococcus aureus*. *Revista de Saúde Pública*, São Paulo, v.22, n.5, p.458-61, out. 1988.
- SEELIGER, H.P.R.; JONES, D. Genus *Listeria* Pirie 1940. In: HOLT, J.G. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Baltimore: Willians and Wilkins, 1986.v.2, p.1599.
- VANDERZANT, C; SPLITTSTOESSER, D. F. *Compendium of Methods for the microbiological examination of foods*. 3 ed. Washington, DC.: APHA, 1992. 1219p.
- VAN LEUSEN, F.M.; VAN SCHOTHORST, M.; BECKERS, H.J. The standard *Salmonella* isolation method. In: CORRY, J.E.L.; ROBERTS, D.; SKNER, F.A. eds. *Isolation and identification methods for poisoning*. New York, Academic, p.35-39, 1982.
- VAN SCHOTHORST, M.; RENAUD, A.M. Dynamics of *Salmonella* isolation with modified Rappaport's medium (R10). *J. Appl. Bacteriol.*, v.54, p.209-15, 1983.
- VIEIRA, M.C.M.; ANDRÉ M.C.D.P.B.; SERAFINI, A.B.; LIMA, S.V.; SILVA, E.V. Avaliação microbiológica do leite pasteurizado "tipo C", comercializado no estado de Goiás no período de Janeiro a Junho de 2000. *Higiene alimentar*, v.15, p.94, 2001.

## **CAPÍTULO 6**

**Estimativa de riscos da contaminação da massa de pão de queijo com *Stahylococcus aureus*, *Salmonella Typhi* e *Listeria monocytogenes***

## 1 Resumo

MACHADO, Elayne Cristina *Estimativa de riscos da contaminação de massa de pão de queijo com *Staphylococcus aureus*, *Salmonella Typhi* e *Listeria monocytogenes**. Lavras: UFLA, 2001. 130p. (Dissertação - Mestrado em Ciência dos Alimentos)<sup>1</sup>.

Tendo em vista a possibilidade de acesso, crescimento e produção de toxinas por bactérias patogênicas no decorrer do processamento do pão de queijo, o qual apresenta em sua formulação básica leite, queijo e ovos, este experimento foi conduzido. Buscou-se, desta maneira, avaliar a possibilidade de riscos a que poderiam estar sujeitos os consumidores, com base na confirmação da presença de patógenos experimentalmente inoculados em massa escaldada, homogeneizada e não modelada do produto. Para a condução deste experimento modulado voltado à microbiologia preditiva, a massa em questão, produzida de acordo com Boas Práticas de Fabricação por uma Indústria Mineira de pão de queijo, uma vez inoculada, foi mantida à temperatura de  $-18^{\circ}\text{C}$  pelo período de 180 dias, que correspondem à vida-de-prateleira do pão de queijo colocado no comércio. Assim, suspensões bacterianas individuais e padronizadas em  $10^4\text{UFC/g}$  de *Staphylococcus aureus*, produtor de enterotoxina A, "SEA", Ref. FUNED;  $10^3\text{UFC/g}$  de *Salmonella Thyphi*, Ref. UNICAMP; e  $10^2\text{UFC/g}$  de *Listeria monocytogenes* sorovar 1/2a, Ref. UNICAMP, foram empregadas. Decorrido o tempo de estocagem da massa inoculada e tendo esta sido mantida em condições de congelamento, foi possível a recuperação e caracterização de *S.Typhi* e *L.monocytogenes*, cujas populações foram estimadas, respectivamente, em  $4,7 \times 10^5$  e  $1,7 \times 10^5\text{UFC/g}$ . As contagens de *S.aureus* foram da ordem de  $1,4 \times 10^6\text{UFC/g}$ , tendo, ainda, sido possível a detecção e identificação de "SEA" diretamente produzida na massa inoculada. Mesmo considerando a realidade do tratamento térmico adicional, a que se expõe o pão de queijo para ser ingerido, a sobrevivência dos patógenos então estudados serve de alerta, sobretudo para o risco de contaminação cruzada, quer seja na própria indústria, restaurantes e similares ou no ambiente doméstico.

Palavras-chaves: cheese-roll dough; inoculação experimental; *S.aureus*, staphylococcic enterotoxin; *Salmonella* sp.; *Listeria monocytogenes*; freezing

---

<sup>1</sup>Comitê Orientador: Dr<sup>a</sup> Eliana Pinheiro de Carvalho – UFLA (Orientadora)  
Dr<sup>a</sup> Maria Lucia Pereira – FUNED (Co-orientadora)

## 2 Summary

MACHADO, Elayne Cristina Risk Estimate of Contamination of Cheese-roll Dough with *Staphylococcus aureus*, *Salmonella Typhi* and *Listeria monocytogenes*. Lavras: UFLA, 2001. 130p. (Dissertation - Master in Food Science)<sup>2</sup>.

This experiment was conducted in view of the possibility of the access and growth of *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes* and *Salmonella Typhi* in cheese-roll dough, whose basic composition is grade C pasteurized milk, parmesan cheese, and pasteurized liquid egg. The analysis was to evaluate the possibility of risks relating to the confirmation of the presence of the pathogens in question in the ready-to-consume product. Homogenized dough of the available product in a cheese-roll industry of Minas Gerais was aseptically transferred to the laboratory and artificially inoculated with standardized suspensions of the bacteria  $10^4$ ,  $10^3$ , and  $10^2$ UFC/g, of *S. aureus* producer of the enterotoxin A, "SEA", *S. Typhi* and *L. monocytogenes*, respectively. Once the time of 180 days for the maintenance of inoculated dough and maintained frozen had elapsed, which corresponds to the shelf-life of the cheese-rolls available in retail establishments and ready for consumption, the recovery and identification of *S. Typhi* and *L. monocytogenes* whose population was estimated at, respectively,  $4,7 \times 10^5$  and  $1,7 \times 10^5$ UFC/g, of the dough examined. The counts of *S. aureus* were of the order of  $1,4 \times 10^6$ UFC/g, with the detection and identification of "SEA" directly in 25g of the inoculated dough made possible. Even if the reality of the additional thermic treatment, 180°C for 30 min., to which the cheese-roll is exposed before consumption, is considered, the survival of the pathogens then studied serves as a warning of the risk of cross-contamination, in the industry itself, restaurants and similar establishments, or even in the domestic environment.

Key-words: cheese-roll dough; experimental inoculation; *S. aureus*, staphylococcic enterotoxin; *Listeria monocytogenes*; *Salmonella* sp.; ; freezing

---

<sup>2</sup>Guidance Committee: Dr<sup>a</sup> Eliana Pinheiro de Carvalho - UFLA (Major Professor)  
Dr<sup>a</sup> Maria Lúcia Pereira – FUNED (Co-Professor)

### 3 Introdução

A partir da década de 80 ocorreu, de maneira bastante significativa, uma crescente preocupação com o fabrico higiênico de produtos alimentícios e com a proteção do consumidor.

Sabe-se que, até o presente momento, não existem dados de literatura sobre o envolvimento do pão de queijo em processos de intoxicação alimentar. Isto parece normal na medida em que, antes de ser consumido, o produto é submetido a tratamento térmico adicional, usualmente estabelecido, seguindo pequenas variações de marca e produtor.

Todavia, nos últimos dez anos, o pão-de-queijo, até então produto de panificação de consumo típico e circunscrito ao Estado de Minas Gerais, devido a grande aceitação de novos consumidores acabou se expandindo para outros Estados, levando fábricas mineiras à escala de produção industrial.

Constando em sua formulação básica de leite, queijo e ovos, produtos de origem animal, o pão de queijo apresenta nutrientes que, facilmente, compatibilizam o acesso e o desenvolvimento de bactérias patogênicas e suas toxinas.

Além desta matéria-prima, o pão de queijo industrializado passa, em seu fluxo de produção, por etapas de estreito contato com manipuladores, como ocorre por ocasião da ralagem do queijo a ser adicionado à massa escaldada e, ainda, quando da homogeneização desta nas masseiras.

A presença dos patógenos *S.aureus*, *S.Thyphi* e *L.monocytogenes*, e dentre outros torna-se possível, quer seja no produto intermediário ou no produto final, a saber pela possibilidade da presença destes na própria matéria-prima, como também através da contaminação por manipuladores, portadores assintomáticos ou não.

Mesmo em se considerando a prevalência, nos dias atuais e em nosso meio, da aplicação das BPF e do sistema APPCC, permanece explícita a inviabilidade da obtenção de alimentos completamente livres de contaminação.

Assim, a quantificação das probabilidades de ocorrência ou não de risco alimentar, por meio de sistema que permita a estimativa destes mesmos riscos (“risk assesment”) envolvidos diretamente ou não no consumo de alimentos, tem se mostrado, a cada dia, tema atual e de interesse crescente (Ross & McMeekin, 1991; Potter, 1996).

A partir da identificação do perigo, isto é, do reconhecimento de que os patógenos em questão podem ser ou virem a ser contaminantes normais do pão de queijo, nestes podendo crescer e ainda produzir toxinas, a probabilidade da contaminação a que os consumidores estariam expostos poderia então ser medida.

Em se considerando, mais uma vez, a necessidade do tratamento térmico efetivo, o qual, segundo Bergdoll (1989), desativa as enterotoxinas estafilocócicas, termoestáveis somente até 100°C durante 30min, e mais ainda, de acordo com Doyle (1989), às células vegetativas de *S.aureus*, *S.Typhi* e *L.monocytogenes* no caso específico do pão de queijo, os riscos do consumidor ficariam vinculados, sobretudo, à possibilidade da contaminação cruzada.

Na contaminação cruzada, torna-se viável a transferência destes patógenos e da enterotoxina estafilocócica, já elaborada ou a ser elaborada, do pão de queijo ainda não assado a outro alimento a ser consumido cru ou com tratamento adicional, que seja insuficiente para a eliminação destes agentes contaminantes.

Esta transferência pode, ainda, vir a ocorrer por meio da superfície de vasilhame e outros utensílios e das mãos do manipulador, pelo contato direto com o pão de queijo, nas mesmas condições, ainda não assado e contaminado.

Outra possibilidade de risco envolvendo este produto poderia estar relacionada à ingestão – debicagem – do produto contaminado, antes de este ser submetido às condições do forno.

Estas possibilidades estariam embasadas no fato de a quantidade de enterotoxina, já estimada em 0,7ng/g, ser suficiente para a instauração da intoxicação estafilocócica (Evenson et al., 1988). Somando-se a isto, as doses mínimas infectantes de *S. Typhi* e *L. monocytogenes* são reconhecidamente baixas, da ordem de  $10^2$ UFC/g e  $10^4$ UFC/g, respectivamente (Doyle, 1989).

Assim, buscou-se, neste experimento, recuperar células de *S. aureus* produtores de “SEA”, *S. Typhi* e *L. monocytogenes*, inoculadas intencionalmente na massa já escaldada, homogeneizada e não modulada de pão-de-queijo, após 180 dias de manutenção à temperatura de congelamento, – 18°C.



## 4 Material e Métodos

### 4.1 Tomada de amostras

Aproximadamente 3kg de massa escaldada, homogeneizada e não modelada foram coletados da mesma masseira na IMPq, após implantação de medidas corretivas e introdução das BPF (*Capítulo 5, p.84*).

A amostra, uma vez acondicionada em frasco estéril, foi transferida ao Laboratório<sup>3</sup>, em condições isotérmicas e em prazo não superior a 2h.

### 4.2 Avaliação da qualidade microbiológica da massa escaldada, homogeneizada e não modelada

Antes de executar o procedimento de inoculação experimental, a massa escaldada, homogeneizada e não modelada foi submetida à análise microbiológica, conforme ensaios efetuados, em triplicata, de acordo Vanderzant & Splittstoesser (1992).

Não existindo parâmetro microbiológico legal que regulamente o pão de queijo no decorrer de seu processamento, adotou-se, para este produto intermediário os mesmos parâmetros que regulamentam o pão de queijo propriamente dito (Brasil, 1997).

Realizou-se, assim, contagem de coliformes fecais, com valor permitido até o máximo de  $10^2$ NMP/g; estafilococos produtores de coagulase, até  $10^3$  UFC/g, clostrídios sulfito redutores, até  $2,0 \times 10^2$  UFC/g; e ausência em 25g de *Salmonella* sp. Incluiu-se ainda, mesmo não recomendada por lei, a pesquisa de *L.monocytogenes*, uma vez que esta também compõe o grupo de linhagens teste a serem experimentalmente inoculadas na massa em questão.

---

<sup>3</sup>Setor de Anacróbios e Epidemiologia Molecular da Divisão de Bromatologia, Toxicologia e Medicamentos (DBTM); Instituto Octávio Magalhães (IOM), Fundação Ezequiel Dias (FUNED)  
Rua Conde Pereira Carneiro, 80 -Bairro Gameleira, 30510-010 Belo Horizonte, MG - laem@funed.mg.gov.br

#### **4.2.1 Preparo da amostra**

Três porções de 25g da massa escaldada, homogeneizada e não modelada foram transferidas, de modo individualizado, para sacos plásticos de primeiro uso, sendo a estes adicionados 225mL de APT, seguindo-se de homogeneização em “Stomacher”.

Foram então preparadas diluições seriadas até 1/1000 em porções de 90mL do mesmo diluente, para o procedimento das determinações bacteriológicas.

#### **4.2.2 Determinação do Número Mais Provável (NMP) de coliformes fecais, segundo Vanderzant & Splittstoesser (1992)**

Utilizou-se o método de fermentação de lactose em tubos múltiplos em que foi inoculado 1mL das diluições 1/10, 1/100 e 1/1000, em três séries de três tubos contendo caldo LST.

Após incubação a 35°C durante 48 horas, os tubos presuntivamente positivos, que evidenciaram produção de gases nos tubos de Durham, foram submetidos aos testes confirmatórios para enumeração de coliformes fecais em caldo EC, com incubação em banho-maria a 44,5°C.

Resultados de densidade de coliformes fecais foram expressos em NMP/g da amostra analisada.

#### **4.2.3 Enumeração de estafilococos produtores e não produtores de coagulase, segundo Vanderzant & Splittstoesser (1992)**

Inoculou-se, com auxílio de alça de Drigalski, sobre superfície de BP, 0,1mL das diluições 1/10, 1/100 e 1/1000. Após completa incorporação, as placas inoculadas foram incubadas a 37°C durante 48 horas. Decorrido o período de incubação, procedeu-se a contagem das placas anotando-se, separadamente, resultados para colônias típicas e atípicas. Colônias típicas de coloração negra, puntiformes e circundadas por um halo branco opaco e outro, mais externo,

transparente; e colônias atípicas, cinzentas, mucóides e desprovidas de halo e negras, com apenas um halo, foram pescadas. Teste de produção de coagulase foi realizado em cerca de 2% das colônias, sendo considerados como positivos tubos com coágulo 4+.

Estas colônias, de forma a distinguir o perfil de *S.aureus*, foram caracterizadas quanto à produção de coagulase e termonuclease e quanto à capacidade de lisar hemácias de carneiro e de utilizar glicose e manitol, em condições de anaerobiose.

Independentemente de haverem apresentado ou não perfil de distinção da linhagem teste, tanto colônias produtoras ou não de coagulase foram avaliadas quanto à produção de enterotoxinas.

Assim, cerca de 0,5mL de culturas jovens crescidas em caldo “BHI” foi transferido e espalhado, com auxílio de alça de Drigalski, sobre superfície de ágar “BHI” concentrado 2 vezes, recoberto com membrana de diálise, e incubado a 37°C por 24 horas (Hallander, 1965; Casman *et al.* 1969; Jarvis & Lawrence, 1970).

Após o período de incubação, a lavagem para recuperação do crescimento bacteriano foi realizada com 2,5mL de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0,01M, em três etapas, utilizando-se 1mL, 1mL e 0,5mL do mesmo tampão. O líquido de lavagem obtido foi centrifugado a 7400g, durante 20 minutos a -4°C, e o sobrenadante utilizado para averiguação de produção de enterotoxinas.

Para este procedimento, através do ensaio de “RPLA” (Igarashi *et al.* 1986), 25µL da amostra a se pesquisada foram aplicados em orifícios de placa de microtítulo e, em seguida, adicionados de outros 25µL de partículas de látex sensibilizadas com antitoxinas específicas, tomando-se o cuidado da prévia adição de 5% de IgG normal de coelho ao extrato sobrenadante de cultura, para evitar a formação de reações inespecíficas (Ey *et al.* 1978; Pereira, 1996). A

placa de microtítulo, uma vez inoculada, permaneceu por 18h à temperatura ambiente, sem agitação.

#### 4.2.4 Enumeração de clostrídios sulfito redutores

Inoculou-se, por incorporação 1mL, das diluições 1/10 e 1/100, em duplicata, em placas de Petri com ágar “SPS”. Após incubação a 46°C durante 48h, em sistema de anaerobiose “Gas Pack”, bioMérieux, contaram-se colônias negras, que foram transferidas para caldo “BHI”, incubadas a 37°C por 24h e, posteriormente, submetidas ao teste de coloração de Gram. Esfregaços foram examinados ao microscópio para confirmação da presença de bastonetes Gram positivos esporulados ou não.

Resultados foram expressos em UFC de clostrídios sulfitos redutores/g da amostra.

#### 4.2.5 Pesquisa de *Salmonella* sp.

Para o pré-enriquecimento, foram pesados e homogeneizados, em “Stomacher”, 25g da amostra em 225mL de APT, com incubação a 35°C durante 24 horas (Van Leusen *et al.* 1982). Foi transferido 0,1mL do crescimento obtido para caldo de Rappaport-Vassiliadis, segundo Van Schothorst & Renaud (1983). Após incubação deste a 37°C por 24h, com auxílio de alça de níquel-cromo, procederam-se sementeiras por estrias em ágar SS e ágar de Hecktoen, com incubação a 35°C, durante 24 horas (International Commission on Microbiological Specifications for Foods, 1992; Food and Drug Administration. Bacteriological Analytical Manual, 1992; Vanderzant & Splittstoesser, 1992). Colônias não fermentadoras de lactose, suspeitas de *Salmonella*, foram repicadas para o ágar inclinado Rugai (Pessoa e Silva) modificado e, posteriormente, submetidas à

classificação antigênica<sup>4</sup> em sorogrupo/sorovar, através de soroglutinação em lâmina utilizando-se anti-soros policlonais adsorvidos para fatores somáticos e flagelares.

#### 4.2.6 Pesquisa de *L.monocytogenes*

Para o pré-enriquecimento, foram pesados e homogeneizados, em “Stomacker”, 25g da amostra em 225mL de APT, com incubação a 35°C durante 24 horas. Foi transferido, então, 0,1mL do crescimento obtido para caldo “LEB”, incubando-se a 37°C durante 24h (Van Leusen, 1982; Lovett, 1988; Bush & Donnelly, 1992; Vanderzant & Splitstoesser, 1992). Para isolamento diferencial, o material foi semeado, por esgotamento com alça de níquel-cromo, para ágar Palcam e ágar Oxford, seguindo-se incubação a 35°C pelo período de até 48h.

Para a contagem, adotou-se o seguinte perfil de colônias: pequenas puntiformes; arredondadas; contra a luz, apresentando cor esverdeada; quando do início da hidrólise da esculina, atingindo, posteriormente, tons esbranquiçados, para o ágar Palcam.

No que diz respeito ao ágar Oxford, foram selecionadas aquelas que apresentaram tamanho médio; arredondadas, na cor branca leitosa, que passa a marrom brilhante e transparente, quando da luz incidente.

Foi feita identificação bioquímica de linhagens compatíveis ao gênero *Listeria* foi, após crescimento de 24h a 35°C em caldo “BHI”, conduzida através de repiques por estrias com auxílio de alça de níquel-cromo, em ágar “TSA” enriquecido com 6% de extrato de levedura. Após incubação a 35°C por 24h,

---

<sup>4</sup>Análise sorológica realizada no Setor de Microbiologia, Divisão de Biologia Médica (DBM), Instituto Octávio Magalhães (IOM), Fundação Ezequiel Dias (FUNED) -Rua Conde Pereira Carneiro, 80 -Bairro Gameleira ,30510-010 -Belo Horizonte, MG -lammed@funed.mg.gov.br

linhagens foram avaliadas, através da ação de luz incidente, quanto à presença da tonalidade cinza-azulada.

A partir das colônias assim caracterizadas, realizaram-se testes de coloração de Gram; motilidade a 25°C, em meio ágar “SIM”, lise de hemácias em ágar “TSA” suplementado com sangue de carneiro a 5%; “CAMP test” utilizando culturas de *Rodococcus equi* e *S.aureus* sub-espécie *aureus*, produtor de “SEH”, e fermentação dos carboidratos xilose e manitol (Rocourt, 1989). Além destes, utilizou-se também o Sistema Api *Listeria*, bioMérieux, Craponne, France, para ampliação de respostas bioquímicas.

Linhagens então bioquimicamente caracterizadas como pertencentes ao gênero *Listeria* foram encaminhadas para análise sorológica em Laboratório de Referência<sup>5</sup>. A classificação antigênica em sorogrupo/sorovar foi realizada por soroaglutinação em lâmina utilizando-se anti-soros policlonais adsorvidos para fatores somáticos e flagelares (Seeliger & Jones, 1979).

#### **4.3 Inoculação experimental da massa escaldada, homogeneizada e não modelada com *S.aureus* produtor de “SEA”, Ref. FUNED**

Duzentos gramas de massa escaldada, homogeneizada e não modelada foram transferidos para Becker de capacidade de 1000mL, com auxílio de colher e espátula esterilizadas. Após esta transferência, a amostra foi inoculada com *S.aureus* produtor de “SEA”, Ref. FUNED, linhagem padrão isolada por Pereira *et al.* (1994) a partir de bolo de confeitaria envolvido em surto de intoxicação alimentar em Belo Horizonte, MG (Tabela 1).

---

<sup>5</sup> Laboratório de Bacteriologia, Instituto Oswaldo Cruz, FIOCRUZ, Rio de Janeiro, RJ

**Tabela 1** Características da linhagem de *S.aureus* produtor de “SEA”, Ref. FUNED<sup>1</sup>, empregada na inoculação experimental de massa escaldada homogeneizada e não modelada

Procedência do microrganismo	Ref.	Crescimento em ágar “BP”	Ensaio bioquímicos					“SE” produzida
			Coag	Glic	Man	Hem	TNase	
Bolo de confeitaria	FUNED	T	+	+	+	+	+	“SEA”

<sup>1</sup>Publicação de Pereira *et al* (1994); T: colônias típicas – coloração negra, puntiformes e circundadas por um halo branco opaco e outro, mais externo, transparente; Coag.: coagulase Glic. e Man.: glicose e manitol, em anaerobiose; Hem.: hemólise; Tnase: termonuclease; “SE”: enterotoxina estafilocócica; +: positivo; -: negativo

A densidade populacional do microrganismo foi estabelecida por intermédio de Curva Padrão de Crescimento, elaborada a partir de leitura de absorvância a 550nm e contagem de células por meio de diluições seriadas, em “PCA”, de forma a gerar inóculo inicial (tempo zero) aproximado em 10<sup>4</sup>UFC/g de massa (Figura 1).

Uma vez inoculada, a massa foi fracionada em seis alíquotas de 25g, embaladas em sacos plásticos de primeiro uso e prontamente armazenadas em condições de congelamento -18°C, durante 180 dias.

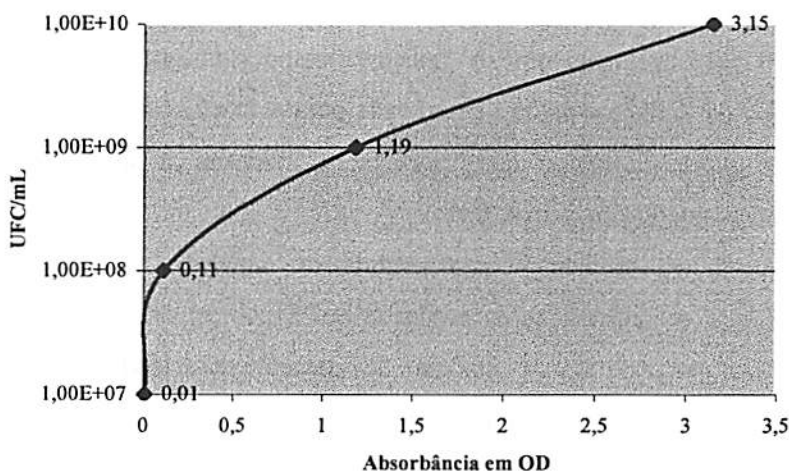


FIGURA 1 Curva padrão de crescimento de *S.aureus* produtor de "SEA", Ref. FUNED; Leitura de absorvância 550nm.

#### 4.3.1 Contagem do microrganismo e confirmação de produção de enterotoxina por *S.aureus* produtor de "SEA", Ref. FUNED, experimentalmente inoculado na massa escaldada, homogeneizada e não modelada

Decorrido o tempo de congelamento, a massa foi analisada quanto à contagem de células viáveis de *S.aureus* produtor de "SEA", Ref. FUNED, utilizando-se ágar "BP" incubado a 37°C até 72h, semeando-se por espalhamento 0,1mL das diluições seriadas preparadas a partir da homogeneização de 25g da massa em APT.

Multiplicando-se a média das contagens de colônias pelo fator de diluição utilizado, resultados foram expressos como UFC/mL da amostra (Vanderzant & Splittstoesser, 1992).



Foram consideradas, para efeito desta contagem, somente aquelas colônias que apresentavam o mesmo comportamento morfotintorial e bioquímico da linhagem padrão empregada para a inoculação, descartando-se quaisquer outras colônias que, porventura, viessem a crescer (conforme procedimento contido no item 4.2.3).

Adotou-se também, como medida de segurança e para efeito de confiabilidade, a confirmação da produção de “SEA” em extratos sobrenadantes de cultura, a partir de 5% das colônias devidamente caracterizadas, adotando-se igual procedimento já detalhado no item 4. 2. 3.

#### **4.3.2 Verificação de produção e identificação de enterotoxina na massa escaldada, homogeneizada e não modelada experimentalmente inoculada com *S.aureus* produtor de “SEA”, Ref. FUNED**

Para a verificação de produção de enterotoxina na massa escaldada, homogeneizada e não modelada, foi utilizado o teste de “ELISA-SET-EIA”.

Para este ensaio foram empregados 20mL do extrato da massa obtido a partir de prévia homogeneização de 125g da amostra com 150mL de tampão salina-fosfato centrifugados a 7400g, durante 20min.

A verificação da presença de enterotoxina foi realizada com auxílio de bolas de poliestireno sensibilizadas com antitoxinas específicas, seguindo idêntico procedimento reportado através do “kit de ELISA-SET-EIA” (Fey & Pfister, 1984).

#### **4.4 Inoculação experimental da massa escaldada, homogeneizada e não modelada com *S.Typhi*, Ref. UNICAMP**

Duzentos gramas de massa escaldada, homogeneizada e não modelada foram transferidos para Becker de capacidade de 1000mL, com auxílio de colher e espátula esterilizadas. Após esta transferência, a amostra foi inoculada com

*S.Typhi*, Ref. UNICAMP , linhagem padrão isolada de infecção de adulto, (Hospital das Clínicas, UNICAMP, Campinas, SP,Tabela 2).

TABELA 2 Características da linhagem de *S.Typhi*, Ref. UNICAMP, empregada na inoculação experimental de massa escaldada, homogeneizada e não modelada

Procedência do microrganismo	Ref.	Crescimento em ágar Hektoen	Produção de gás e H <sub>2</sub> s, em ágar inclinado de Rugai
Infecção de adulto	UNICAMP	Colônias transparentes	-/fraca

-: negativo

A densidade populacional do microrganismo foi estabelecida por intermédio de Curva Padrão de Crescimento, elaborada a partir de leitura de absorvância a 550nm e contagem de células de acordo por meio de diluições seriadas, em “PCA”, de forma a gerar inóculo inicial (tempo zero) aproximado em 10<sup>4</sup>UFC/g de massa (Figura 2).

Uma vez inoculada, a massa foi fracionada em seis alíquotas de 25g, embaladas em sacos plásticos de primeiro uso e prontamente armazenadas em temperatura de congelamento, -18°C, durante 180 dias.

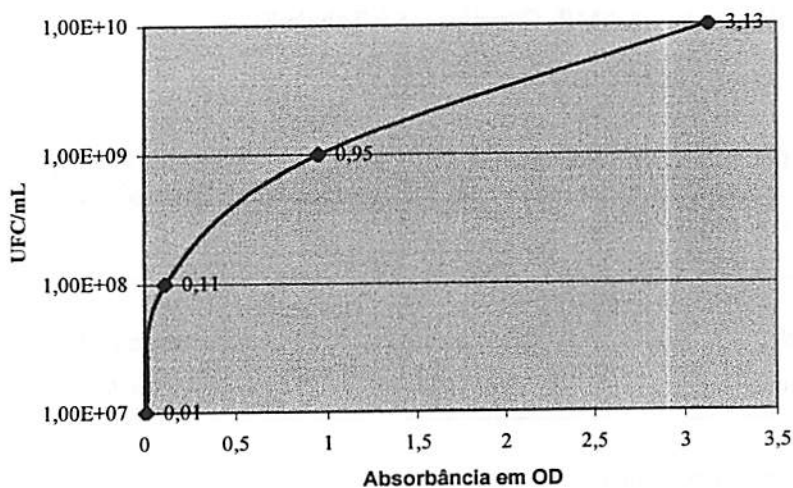


FIGURA 2 Curva padrão de crescimento de *Salmonella* sp Ref. UNICAMP;  
Leitura de absorvância: 550nm.

#### 4.4.1 Contagem de *Salmonella Typhi*, Ref. UNICAMP, experimentalmente inoculada na massa escaldada, homogeneizada e não modelada

Decorrido o tempo de congelamento, a massa foi analisada quanto à contagem de células viáveis de *S.Typhi*, Ref. FUNED, utilizando-se ágar Hektoen incubado a 37°C até 72h, semeando-se por espalhamento 0,1mL das diluições seriadas preparadas a partir da homogeneização de 25g da massa em APT.

Multiplicando-se a média das contagens de colônias pelo fator de diluição utilizado, resultados foram expressos como UFC/mL da amostra (Vanderzant & Splittstoesser, 1992).

Foram consideradas, para efeito desta contagem, somente aquelas colônias que apresentavam o mesmo comportamento morfotintorial e bioquímico da linhagem empregada para a inoculação, descartando-se quaisquer

outras colônias que, porventura, viessem a crescer (conforme procedimento contido no item 4.2.5).

#### 4.5 Inoculação experimental da massa escaldada, homogeneizada e não modelada com *L.monocytogenes* sorovar 1/2a, Ref.UNICAMP

Duzentos gramas de massa escaldada, homogeneizada e não modelada foram transferidos para Becker de capacidade de 1000mL, com auxílio de colher e espátula esterilizadas. Após esta transferência, a amostra foi inoculada com *L.monocytogenes* sorovar1/2a, Ref. UNICAMP, linhagem padrão isolada de processo septicêmico em recém-nascido (Hospital das Clínicas, UNICAMP, Campinas, SP,Tabela 3).

TABELA 3 Características da linhagem de *L.monocytogenes* sorovar 1/2a, Ref. UNICAMP, empregada na inoculação experimental de massa escaldada, homogeneizada e não modelada

Procedência do microrganismo	Ref.	Crescimento em ágar "TSA + YE"	Utilização de açúcar		Motilidade em ágar SIM a 25°C	Camp test	
			Xil	Man		<i>R.equi</i>	<i>S.aureus</i>
Processo septicêmico de recém-nascido	UNICAMP	T	+	+	+	-	+

Xil. e Man.: xilose e manitol; Agar "TSA + YE": agar triptcaseína acrescido de 0,5% de extrato de levedura; +: positivo; -: negativo

A densidade populacional do microrganismo foi estabelecida por intermédio de Curva Padrão de Crescimento, elaborada a partir de leitura de absorvância a 550nm e da contagem de células por meio de diluições seriadas,

em “PCA”, de forma a gerar inóculo inicial (tempo zero) aproximado em  $10^2$ UFC/g de massa (Figura 3).

Uma vez inoculada, a massa foi fracionada em seis alíquotas de 25g, embaladas em sacos plásticos de primeiro uso e prontamente armazenadas em temperatura de congelamento,  $-18^{\circ}\text{C}$ , durante 180 dias.

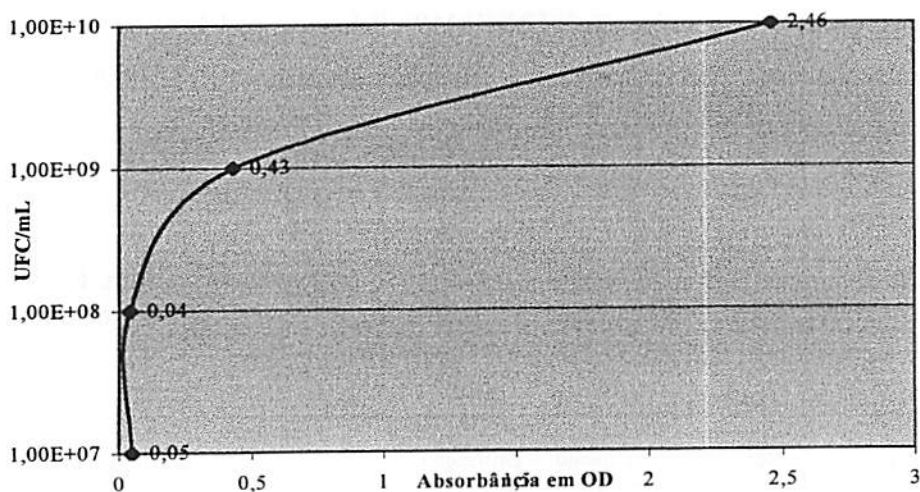


FIGURA 3 Curva padrão de crescimento da *L.monocytogenes* sorovar 1/2a, Ref. UNICAMP, leitura de absorvância de 550nm

#### 4.5.1 Contagem de *L.monocytogenes* sorovar 1/2a, Ref. UNICAMP, experimentalmente inoculada na massa esaldada, homogeneizada e não modelada

Decorrido o tempo de congelamento, a massa foi analisada quanto à contagem de células viáveis de *L.monocytogenes* sorovar 1/2a, Ref. UNICAMP, utilizando-se ágar Palcam incubado a  $37^{\circ}\text{C}$  até 72h, semeando-se por espalhamento 0,1mL das diluições seriadas preparadas a partir da homogeneização de 25g da massa em caldo ‘LEB’.

Multiplicando-se a média das contagens de colônias pelo fator de diluição utilizado, resultados foram expressos como UFC/mL da amostra (Vanderzant & Splittstoesser, 1992).

Foram consideradas, para efeito desta contagem, somente aquelas colônias que apresentavam o mesmo comportamento morfotintorial e bioquímico da linhagem empregada para a inoculação, descartando-se quaisquer outras colônias que, porventura, viessem a crescer (conforme procedimento contido no item 4.2.6).

## 5 Resultados e Discussão

Os resultados da avaliação microbiológica da massa escaldada, homogeneizada e não modelada procedida em uma etapa anterior à inoculação com as linhagens teste confirmaram a boa qualidade do produto.

Em relação à contagem de coliformes fecais e clostrídios sulfito redutores, valores iguais a 93,3 NMP/g e <100UFC/g foram obtidos.

Por sua vez, *Salmonella* sp. e *Listeria monocytogenes* mostraram-se ausentes em 25g da amostra pesquisada.

Em relação ao grupo de estafilococos, somente produtores de coagulase foram detectados, conforme população igual a  $3,0 \times 10^3$ UFC/g, valor igualmente compatível àquele estabelecido por lei (Brasil, 1997).

Todavia, o comportamento morfotintorial e bioquímico deste grupo de microrganismos mostrou-se distinto daquele apresentado pela linhagem teste *S.aureus* produtor de “SEA”, Ref. FUNED, inclusive pela confirmação da não produção de qualquer enterotoxina que pudesse ter sido detectada pelo método de “RPLA” (Tabela 1 e 4).

TABELA 4 Características de estafilococos produtores de coagulase detectados em massa escaldada, homogeneizada e não modelada disponibilizada na IMpq

Procedência	Crescimento em ágar “BP”	Ensaio bioquímicos					“SE”
		Coag	Glic	Man	Hem	TNase	
Massa escaldada, homogeneizada e não modelada	AT	+	+/-	+/-	-	-	Nd

IMpq: Indústria Mineira de pão de queijo; AT: colônias atípicas – coloração negra ou negro-acinzentada, não circundadas por um halo branco opaco e outro, mais externo, transparente, halos de lecitinase e lipase; Coag: coagulase Glic e Man: glicose e manitol, em anaerobiose Hem: hemólise, Tnase: termonuclease; “SE”: enterotoxina estafilocócica; +: positivo; -: negativo; +/-: positivo no ápice e negativo no fundo; Nd: Não detectado

Foi possível, com base neste perfil bioquímico apresentado pelo grupo de estafilococos produtores de coagulase, nítida diferenciação entre estes e a população artificialmente inoculada.

Pela análise visual, a partir do ágar BP, as colônias oriundas da própria massa puderam ser discriminadas, por meio da aparência atípica, AT, coloração negra ou negro-acinzentada, porém não circundadas por halo duplo de lecitinase e lipase e, bioquimicamente, de acordo com o distinto perfil: não produção de termonuclease e hemolisina; não produção de enterotoxinas e incompleta utilização dos açúcares glicose e manitol, em anaerobiose.

Desta maneira, tais colônias não foram computadas junto às células viáveis da linhagem teste inoculada.

Os dados apresentados a seguir demonstram as contagens obtidas para as linhagens teste, *S.aureus* produtor de "SEA", Ref. FUNED; *S.Tiphy*, Ref. UNICAMP e de *L.monocytogenes*, Ref. UNICAMP, na massa escaldada, homogeneizada e não modelada, experimentalmente inoculada e armazenada a  $-18^{\circ}\text{C}$ , durante 180 dias.

TABELA 5 Contagens apresentadas pelas linhagens testes<sup>1</sup> em massa escaldada, homogeneizada e não modelada armazenada a  $-18^{\circ}\text{C}$ , durante 180 dias

Linhagens padrão	Massa escaldada, homogeneizada e não modelada	
	Inóculo inicial (UFC/g)	População detectada, após 180 dias a $-18^{\circ}\text{C}$ (UFC/g)
<i>S.aureus</i> produtor de "SEA", Ref. FUNED	$5,8 \times 10^4$	$1,4 \times 10^6$
<i>S.tiphy</i> , Ref. UNICAMP	$2,2 \times 10^3$	$4,7 \times 10^5$
<i>L.monocytogenes</i> , Ref. UNICAMP	$8,4 \times 10^2$	$1,0 \times 10^5$

<sup>1</sup>Valores médios obtidos para ensaios realizados em triplicata



Os valores de contagens observados, decorrido o tempo de estoque, evidenciaram populações estimadas em  $10^6$ ,  $10^5$  e  $10^5$  UFC/g da massa escaldada, homogeneizada e não modelada. Acréscimo de dois, dois e três ciclos log. foi verificado para *S.aureus*, *S.Typhi* e *L.monocytogenes*, respectivamente.

Quanto à produção de enterotoxinas, o extrato sobrenadante da cultura de *S.aureus* experimentalmente inoculado confirmou-se enterotoxigênico, tendo sido possível a identificação de “SEA” através do ensaio de aglutinação reversa e passiva em látex, “RPLA”.

De maneira idêntica, “SEA” pôde ser detectada diretamente na massa estocada por 180 dias, em condições de congelamento, de acordo com a metodologia de “ELISA-SET-EIA”.

Os microrganismos *L.monocytogenes*, *Salmonella* sp. e *Staphylococcus aureus* vêm sendo, com freqüência, detectados em produtos de origem animal. Diversos são os relatos de literatura que citam a contaminação de queijo e leite com estes patógenos, sem esquecer os relatos de episódios de intoxicação alimentar para os dois últimos microrganismos (Pereira *et al.* 1991; Carmo *et al.* 1996; Pereira *et al.* 2001). No tocante ao ovo, de maneira especial o grupo *Salmonella* tem sido detectado (Oliveira, 1998).

Trabalho realizado por Dias *et al.* (1997) confirmou a presença deste microrganismo em amostras de pão de queijo não assado e disponível no comércio do município de Belo Horizonte, MG.

Em se considerando a situação particular do pão de queijo, que antes de ser consumido é submetido ao tratamento térmico adicional, os riscos aos quais se submetem o consumidor ficariam vinculados, sobretudo, à possibilidade de uma contaminação cruzada.

Na contaminação cruzada, torna-se viável a transferência destes patógenos, e ainda da enterotoxina estafilocócica, já elaborada ou a ser elaborada, do pão-de-queijo ainda não assado a um outro alimento a ser

consumido cru ou com tratamento adicional insuficiente para a eliminação destes agentes contaminantes.

Esta transferência poderia ainda vir a ocorrer por meio da superfície de vasilhame e outros utensílios e das mãos do manipulador, através do contato direto com o pão de queijo, nas mesmas condições, ainda não assado e contaminado.

Outra possibilidade de risco envolvendo o pão de queijo poderia estar relacionada à ingestão, debicagem, do produto contaminado, antes de ser submetido às condições do forno.

Estas possibilidades se sustentam no fato de que ínfima quantidade de enterotoxina, já estimada em 0,7ng/g, é suficiente para a instauração da intoxicação estafilocócica (Evenson *et al.* 1988).

Somando-se a isto, as doses mínimas infectantes de *S.Typhi* e *L.monocytogenes* são reconhecidamente baixas, da ordem de  $10^2$ UFC/g (Doyle, 1989), razão pela qual estes microrganismos foram selecionados como linhagens teste para o estudo de microbiologia preditiva então conduzido.

## 6 Referências Bibliográficas

- BALABAN, N.; RASOOLY, A. Review Staphylococcal enterotoxins. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v.61, n.1, p.1-10, Oct. 2000.
- BERGDOLL, M. S. *Staphylococcus aureus*. In: Doyle, M.P. (ed). **Foodborne bacterial pathogens**. New York: Marcel Bekker, 1989. p.463-523.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância Sanitária, Divisão Nacional de Vigilância Sanitária de Alimentos. Portaria nº 451. **Diário Oficial da União**, Brasília, p.8-15, de 19 de set., 1997.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria da Vigilância Sanitária, Divisão Nacional de Vigilância Sanitária. Portaria Federal nº1428. **Diário Oficial da União**, Brasília, 26 de nov.,1993.
- BUSH, S.V.; DONNELLY, C.W. Development of a Repair-Enrichment Broth for Resuscitation of Heat-Injured *Listeria monocytogenes* and *Listeria innocua*. **Applied Environmental Microbiology**, Washington, v.58, n.1, p.14-20, Jan. 1992.
- CARMO, L.S.; VIEIRA, A.C.; REIS, J.D.A.P.; NASCIMENTO, R.S.; PEREIRA, M.L.; SANTOS, E.J.; BERGDOLL, M.L. *Staphylococcus aureus* and *Salmonella Enteritidis* present in food implicated in food poisoning. **Revista de Microbiologia**, São Paulo, v.27, n.2, p.122-25, abr/jun. 1996.
- CASMAN, E.P.; BENNET, A.E.; DORSEY, A.E. The microslide gel double gel diffusion test for the detection and assay of staphylococcal enterotoxins. **Health Laboratory Science**, Washington, v.6, n.4, p.185-198, 1969.
- DOYLE, M.P. (ed). **Foodborne bacterial pathogens**. New York: Marcel Bekker, 1989. p.463-523.
- EY, P.L.; PROWSE, S.J.; JENKEN, C.R. Isolation of pure IgG1, IgG2a and IgG2b imunoglobulins from mouse serum using protein A-Sepharose. **Biochemistry**, Washington, v.15, n.8, p.429-436, Apr. 1978.

EVENSON, M.L.; HINDS, M.W.; BERNSTEIN, R.S. et al. Estimation of human dose of staphylococcal enterotoxin A from a large outbreak involving chocolate milk. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v.7, n.4, p.311-316, Dec. 1988.

FDA, FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. **Bacteriological Analytical Manual**. 7.ed. Arlington, Association of Official Analytical Chemists. 1992.

FEY, H.; PFISTER, H. RÜEGG, O. Comparative evaluation of different enzyme-linked immunosorbent assay systems for the detection of staphylococcal enterotoxins A, B, C, and D. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v.19, n.1, p.34-38, 1984.

HALLANDER, H.O. Production of large quantities of enterotoxin B and other staphylococcal toxins on solia media. **Acta Pathologica Microbiologica Scandinavica**, Copenhagen, v.63, n.2, p.299-305, 1965.

ICMSF. INTERNATIONAL COMMISSION ON MICROBIOLOGICAL SPECIFICATIONS FOR FOODS. **Microbiologia de los alimentos: Características de los patógenos microbianos**, 1996.

IGARASHI, H.; FUJIKAWA, H.; SHINGAKI, M. et al. Latex agglutination test for staphylococcal toxic shock syndrome toxin-1. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v.23, n.2, p.509-512, Mar. 1986.

JARVIS, A.W. & LAWRENCE, R.C. Production of high titers of enterotoxins for the routine testing of staphylococci. **Applied of Microbiology**, Washington, v.19, n.6, p.698-699, June 1970.

LOVETT, J. Isolation and identification of *Listeria monocytogenes* in dairy foods. **Journal of the Association Official Analytical Chemistry**, Cincinnati, v.71, n. 3, p.658-660, May/June 1988.

OLIVEIRA, D.D.; SILVA, E.N. Salmonelas em casca e gema de ovos comerciais de galinha. Estudo de condições de contaminação e sanitização. In: CONGRESSO LATINO AMERICANO DE MICROBIOLOGIA E HIGIENE DE ALIMENTOS, 5., 1998, Águas de Lindóia. **Anais... Águas de Lindóia: [s.n.]**, 1998. p.70.

PEREIRA, M.L.; LARA, M.A.; DIAS, R.S.; CARMO, L.S. Intoxicação por *Staphylococcus aureus* provocada por queijo "Tipo Minas". **Revista de Microbiologia**, v.22, n.4, p.349-50, out/dez. 1991.

PEREIRA, M.L.; CARMO, L.S.; LARA, M.A. et al Enterotoxigenic staphylococci from food handlers working in an industrial kitchen in Belo Horizonte, MG (Brazil). **Revista de Microbiologia**, São Paulo, v. 25, n.4, p.274-278, out/dez. 1994.

PEREIRA, M. L. **Estafilococos coagulase negativos pauciprodutores de enterotoxinas e relato de um surto por espécie coagulase positiva**. 1996. 143p. Tese (Doutorado em Ciência dos Alimentos) – Universidade Estadual de Campinas, Campinas.

PEREIRA et al. Recovery of *Listeria monocytogenes* in minas-type cheese stored at low temperature. **Ciencia e Tecnología dos Alimentos**, Campinas, 2001 (submetido)

ROCOURT, J. La listeriose 1985-1995: Aspects microbiologiques et épidémiologiques. **Bulletin de L'Académie Nationale de Médecine**, Paris, v.179, n.8, p.1613-14, Nov. 1995.

ROSS, T.; MCMEEKIN, T.A. Predictive microbiology. **Food Australia**, Hoburt, v.43, n.4, May. 1991.

SEELIGER, H.P.R.; JONES, D. Genus *Listeria* Pirie 1940. In: HOLT, J.G. **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology**. Baltimore: Willians and Wilkins, 1986.v.2, p.1599.

POTTER, M.E. Risk Assessment terms and definitions. **Journal of Food Protection**, Ames, p.6-9, 1996. Supplement.

VANDERZANT, C; SPLITTSTOESSER, D. F. **Compedium of Methods for the microbiological examination of foods**. 3 ed. Washington, DC.: APHA, 1992. 1219p.

VAN LEUSEN, F.M.; VAN SCHOTHORST, M.; BECKERS, H.J. The standard *Salmonella* isolation method. In: CORRY, J.E.L.; ROBERTS, D.; SKNER, F.A. Eds. **Isolation and identification methods for poisoning**. New York: Academic Press, 1982.p.35-39.

VAN SCHOTHORST, M.; RENAUD, A.M. Dynamics of *Salmonella* isolation with modified Rappaport's medium (R10). **Journal Applied Bacteriology**, Oxford, v.54, n.2, p.209-15, 1983.

## **ANEXO**

### **ANEXO A**

**Página**

**TABELA 1A** Relação de amostras coletadas e analisadas frente aos parâmetros referenciados por lei, conforme monitoramento microbiológico realizado, em três etapas, na IMpq .....124

**TABELA 2A** Custos de análise microbiológica de alimentos, de acordo com parâmetros referenciados por lei.....128

**TABELA 3A** Relação de custos analíticos para a realização do monitoramento microbiológico realizado na IMpq .....129

**TABELA 4A** Despesas com APPCC e implantação de BPF na IMpq..... 130

## ANEXO A

**TABELA 1A** Relação de amostras coletadas e analisadas frente aos parâmetros referenciados por lei<sup>1</sup>, conforme monitoramento microbiológico realizado, em três etapas, na IMPq<sup>2</sup>

Tipo de substrato/procedência	Amostras coletadas (n°)	Número de alíquotas (análise em triplicata)	Parâmetros microbiológicos referenciados por lei
<b>Primeira etapa</b>			
<b>Água tratada</b>			
Pias	08	24	A, B, C
Bebedouro	02	6	A, B, C
Caixa d'água	03	9	A, B, C
<b>Matéria-prima</b>			
Polvilho azedo	04	12	B, D, E, H, I
Fécula de mandioca	04	12	B, D, E, H, I
Soro de leite pasteurizado	04	12	A, B, C, D, E, F, G, H, I
Queijo parmesão inteiro	04	12	B, G, H, I
Queijo parmesão ralado	04	12	B, C, G, H, I
Ovo líquido pasteurizado	04	12	B, C, H, I
Leite pasteurizado tipo C	04	12	A, B, C, H
<b>Produto intermediário</b>			
Massa escaldada	04	12	B, F, I
Massa homogeneizada	04	12	B, F, I
Massa modelada	04	12	B, F, I
Massa modelada congelada	04	12	B, F, I
<b>Produto final</b>			
Massa congelada embalada	10	30	B, F, I
<b>Sub-total</b>	<b>67</b>	<b>201</b>	

<sup>1</sup>Portaria nº451, de 19 de setembro de 1997, SNVS/MS; <sup>2</sup>IMPq: Indústria Mineira de pão de queijo A: coliformes totais; B: coliformes fecais; C: bactérias aeróbias mesófilas; D: *B.cereus*; E: bolores e leveduras; F: clostrídios sulfitos redutores; G: *L.monocytogenes*; H: *Salmonella* sp; I: estafilococos produtores de coagulase

...continua...

TABELA 1A Cont

Tipos de substrato/procedência	Amostras coletadas (n°)	Número de alíquotas (análise em triplicata)	Parâmetros microbiológicos referenciados por lei
<b>Equipamentos e utensílios</b>			
Betoneira	05	15	B, I
Masseira	05	15	B, I
Máquina de ralagem de queijo	01	3	B, I
Modeladora	01	3	B, I
Empacotadeira	01	3	B, I
Recipientes plásticos	02	6	B, I
Espátula metálica	01	3	B, I
<b>Material clínico</b>			
Orofaringe + fossas nasais + leite sub-ungüal	13	13	I, J
<b>Sub-total</b>	<b>55</b>	<b>61</b>	

<sup>1</sup>Portaria nº451, de 19 de setembro de 1997, SNVS/MS; <sup>2</sup>IMpq: Indústria Mineira de pão de queijo; A: coliformes totais; B: coliformes fecais; C: bactérias aeróbias mesófilas; D: *B.cereus*; E: bolores e leveduras; F: clostrídios sulfitos redutores; G: *L.monocytogenes*; H: *Salmonella* sp; I: estafilococos produtores de coagulase; J: pesquisa de enterotoxinas estafilocócicas; Material clínico não foi analisado em triplicata.

...continua...



TABELA 1A Cont

Tipo de substrato/procedência	Número de amostras coletadas	Número de alíquotas (análise em triplicata)	Análises microbiológicas realizadas
<b>Segunda etapa</b>			
Matéria-prima			
Polvilho azedo	03	09	B, D, E, H, I
Fécula de mandioca	03	09	B, D, E, H, I
Soro de leite pasteurizado	03	09	A, B, C, D, E, F, G, H, I
Queijo parmesão inteiro	03	09	B, G, H, I
Queijo parmesão ralado	03	09	B, C, G, H, I
Ovo líquido pasteurizado	03	09	B, C, H, I
Leite pasteurizado tipo C	03	09	A, B, C, H
<b>Produto intermediário</b>			
Massa escaldada	03	09	B, F, I
Massa homogeneizada	03	09	B, F, I
Massa modelada	03	09	B, F, I
Massa modelada congelada	03	09	B, F, I
<b>Produto final</b>			
Massa congelada embalada	03	09	B, F, I
<b>Equipamentos e utensílios</b>			
Betoneira	05	15	B, I
Masseira	05	15	B, I
Máquina de ralagem de queijo	01	03	B, I
Modeladora	01	03	B, I
Empacotadeira	01	03	B, I
Recipientes plásticos	02	06	B, I
Espátula metálica	01	03	B, I
Sub-total	52	156	

<sup>1</sup>Portaria nº451, de 19 de setembro de 1997, SNVS/MS; <sup>2</sup>Impq: Indústria Mineira de pão de queijo; A: coliformes totais; B: coliformes fecais; C: bactérias aeróbias mesófilas; D: *B.cereus*; E: bolores e leveduras; F: clostrídios sulfitos redutores; G: *L.monocytogenes*; H: *Salmonella* sp; I: estafilococos produtores de coagulase.

...continua...

TABELA 1A Cont

Tipo de substrato/procedência	Número de amostras coletadas	Número de alíquotas (análise em triplicata)	Análises microbiológicas realizadas
<b>Terceira etapa</b>			
Massa escaldada homogeneizada e não modelada			
Amostra não inoculada	01	03	B, F, G, H, I, J
Amostra inoculada com <i>S.aureus</i>	01	03	I, J
Amostra inoculada com <i>Salmonella</i> sp	01	03	G
Amostra inoculada com <i>L.monocytogenes</i>	01	03	H
Sub-total	04	12	
Total	172	430	

<sup>1</sup>Portaria nº451, de 19 de setembro de 1997, SNVS/MS; <sup>2</sup>Impq: Indústria Mineira de pão de queijo; A: coliformes totais; B: coliformes fecais; C: bactérias aeróbias mesófilas; D: *B.cereus*; E: bolores e leveduras; F: clostrídios sulfitos redutores; G: *L.monocytogenes*; H: *Salmonella* sp; I: estafilococos produtores de coagulase.

**TABELA 2A Custos de análise microbiológica de alimentos, de acordo com parâmetros referenciados por lei<sup>1</sup>**

<b>Parâmetros microbiológicos</b>	<b>Valores médios de preços<sup>2</sup> (R\$)</b>
Bactérias aeróbias mesófilas	23,00
<i>Clostrídios sulfito redutores</i>	35,80
Coliformes <i>fecais</i>	25,00
Coliformes totais	26,50
<i>Bacillus cereus</i>	30,00
Bolores e leveduras	24,90
Estafilococos produtores de coagulase	30,00
Identificação de enterotoxinas estafilocócicas	250,00
<i>Listeria sp</i>	62,50
<i>Salmonella sp</i>	35,00
<b>Total</b>	<b>542,70</b>

<sup>1</sup>Portaria nº451, de 19 de setembro de 1997, SNVS/MS; <sup>2</sup>Valores médios obtidos junto a uma Instituição Pública e um Laboratório Particular, Belo Horizonte, MG

**TABELA 3A Relação de custos analíticos para a realização do monitoramento microbiológico realizado na IMpq<sup>1</sup>**

<b>Tipo de substrato/procedência</b>	<b>Número de alíquotas (análise em triplicata)</b>	<b>Preço unitário (R\$)</b>	<b>Preço total (R\$)</b>
<b>Água tratada</b>	<b>39</b>	<b>76,40</b>	<b>2.979,60</b>
<b>Matéria-prima</b>			
Polvilho azedo	21	144,90	3.042,90
Fécula de mandioca	21	144,90	3.042,90
Soro de leite pasteurizado	21	292,70	6.146,70
Queijo parmesão inteiro	21	152,50	3.202,50
Queijo parmesão ralado	21	175,50	3.685,50
Ovo líquido pasteurizado	21	113,00	2.373,00
Leite pasteurizado tipo C	21	109,50	2.299,50
<b>Produto intermediário</b>			
Massa escaldada	21	90,80	1.906,80
Massa homogeneizada	21	90,80	1.906,80
Massa modelada	21	90,80	1.906,80
Massa modelada congelada	21	90,80	1.906,80
Massa não inoculada	03	175,50	526,50
Massa inoculada	09	315,00	2.835,00
<b>Produto final</b>			
Massa congelada embalada	39	90,80	3541,20
<b>Equipamentos/utensílios</b>			
Betoneira	30	55,00	1650,00
Masseira	30	55,00	1.650,00
Máquina de ralagem de queijo	06	55,00	330,00
Modeladora	06	55,00	330,00
Empacotadeira	06	55,00	330,00
Recipientes plásticos	12	55,00	660,00
Espátula metálica	06	55,00	330,00
<b>Material clínico</b>			
Orofaringe + fossas nasais + leito sub-ungüal	13	250,00	3.250,00
<b>Total</b>	<b>116</b>	<b>2.788,90</b>	<b>49.832,50</b>

**TABELA 4A Despesas com APPCC e implantação de BPF na IMpq**

<b>Serviços realizados</b>	<b>Custos (R\$)</b>
<b>Análise microbiológica</b>	<b>49.832,50</b>
<b>Consultoria (35h)</b>	<b>3.500,00</b>
<b>Total</b>	<b>53.332,50</b>

**APPCC: Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle; BPF: Boas Práticas de Fabricação; IMpq: indústria Mineira de pão de queijo; Consultoria para diagnóstico e planejamento de medidas corretivas, hora técnica estimada em R\$100,00 (SEBRAE, 2001).**