

**AVALIAÇÃO MICROBIOLÓGICA DE  
AMOSTRAS DE  
RICOTAS COMERCIALIZADAS NO  
MUNICÍPIO DE ALFENAS**

**IVANA DE CASSIA RAIMUNDO**

2004

57415

049067

**IVANA DE CASSIA RAIMUNDO**

**AVALIAÇÃO MICROBIOLÓGICA DE AMOSTRAS DE  
RICOTAS COMERCIALIZADAS NO MUNICÍPIO DE ALFENAS**

Dissertação apresentada a Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos, área de concentração em Microbiologia dos Alimentos, para a obtenção do título de Mestre.

**Orientador**

**Prof. Dr. João Evangelista Fiorini**

**Co-orientadora**

**Profª. Dra. Roberta Hilsdorf Piccoli do Valle**

**LAVRAS**

**MINAS GERAIS - BRASIL**

**2004**

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

**Raimundo, Ivana Cássia**

**Avaliação microbiológica de amostras de ricota comercializadas no  
município de Alfenas / Ivana Cássia Raimundo. -- Lavras : UFLA, 2003.  
36p. : il.**

**Orientador: João Evangelista Fiorini.**

**Dissertação (Mestrado) – UFLA.**

**Bibliografia.**

**1. Ricota. 2. Queijo. 3. Contaminação microbiológica. I. Universidade  
Federal de Lavras. II. Título.**

**CDD-576.163**

**-637.352**

**IVANA DE CASSIA RAIMUNDO**

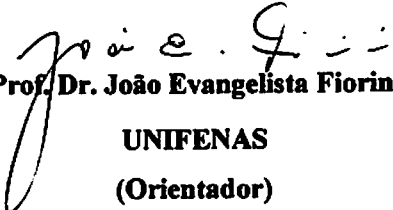
**AVALIAÇÃO MICROBIOLÓGICA DE AMOSTRAS DE  
RICOTAS COMERCIALIZADAS NO MUNICÍPIO DE ALFENAS**

Dissertação apresentada a Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos, área de concentração em Microbiologia dos Alimentos, para a obtenção do título de Mestre.

**APROVADA em 17 de dezembro de 2003**

**Prof. Dr. Jorge Kleber Chavasco - EFOA**

**Profª Drª Roberta Hilsdorf Piccoli do Valle - UFLA**

  
**Prof. Dr. João Evangelista Fiorini**  
**UNIFENAS**  
**(Orientador)**

**LAVRAS**  
**MINAS GERAIS – BRASIL**

## AGRADECIMENTOS

*A Deus,*

que sempre esteve presente.

*Aos meus pais,*

Luiza e Benedito, que acreditaram em meus esforços.

*À minha filha, Laura,*

que é o meu incentivo em tudo que faço.

*A Universidade Federal de Lavras (UFLA) e ao Departamento de Ciência dos Alimentos,*

pela oportunidade de realização do curso.

*Ao Reitor da Universidade José do Rosário Vellano (Unifenas) Prof. Edson Antonio Vellano,*

pelo apoio e confiança.

*À Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Roberta Hilsdorf Piccoli do Valle,*

pela co-orientação, apoio e dedicação, o meu respeito e agradecimento.

*Ao Prof. Dr. João Evangelista Fiorini,*

pela orientação, carinho, atenção, paciência e sabedoria, a minha eterna gratidão.

*Às técnicas do Laboratório de Fisiologia de Microrganismos da Unifenas, Maria e Fátima,*

o meu muito obrigado pela colaboração e trabalho eficiente.

*Aos meus amigos de Curso, Nelma, Luiz Carlos e Estella,*

pela alegria, bons momentos e sugestões.

*À minha grande amiga de turma, Virgínia (Gina),*

pelo carinho, atenção, paciência e seu ombro amigo.

*A todos os funcionários do Departamento,*

pela dedicação.

*Ao Prof. Carlos Pimenta,*

que sempre depositou sua confiança no que realizo.

## SUMÁRIO

	Página
RESUMO .....	i
ABSTRACT.....	ii
1 INTRODUÇÃO.....	1
2 REFERENCIAL TEÓRICO.....	3
2.1 Leite.....	3
2.2 Queijos.....	4
2.3 Ricota.....	6
2.4 Características do gênero <i>Salmonella</i> .....	7
2.5 <i>Staphylococcus aureus</i> .....	9
2.6 <i>Listeria monocytogenes</i> .....	10
2.7 Coliformes.....	13
2.8 Fungos filamentosos e leveduras.....	14
3 MATERIAL E MÉTODOS .....	16
3.1 Produto e coleta das amostras.....	16
3.2 Procedimentos de Análise.....	16
3.3 Metodologia e técnica de análises microbiológicas.....	16
3.3.1 Contagem padrão de bactérias aeróbias mesófilas.....	17
3.3.2 Detecção e quantificação de coliformes a 35° C , coliformes termotolerantes e <i>Escherichia coli</i> .....	17
3.3.3 Detecção e quantificação de estafilococos.....	18
3.3.4 Detecção e quantificação de <i>Salmonella</i> .....	18
3.3.5 Detecção de <i>Listeria monocytogenes</i> .....	19
3.3.6 Quantificação de fungos filamentosos e leveduras.....	19
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	20

5 CONCLUSÕES.....	29
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	30

## RESUMO

RAIMUNDO, Ivana Cássia. Avaliação Microbiológica de Amostras de Ricota Comercializadas no Município de Alfenas. UFLA, 2003. 62f. Dissertação (Mestrado em Ciência dos Alimentos).

A ricota, subproduto da fabricação de queijos, se caracteriza pelo seu alto valor proteico. Sua fabricação consiste na precipitação das proteínas do soro, por meio de calor associado à acidificação. O seu processo de fabricação ainda é artesanal, sendo um produto muito manipulado, na maioria das vezes, sem cuidados de higienização, favorecendo a contaminação por microrganismos causadores de toxinfecções alimentares, entre outros. Também se destaca pelo baixo teor lipídico, razão pela qual é muito utilizada em dietética. Sua comercialização pode apresentar-se de forma fresca, condimentada e até mesmo defumada, entretanto, ainda existe pouco relato científico da sua avaliação microbiológica. O objetivo deste trabalho foi avaliar a qualidade microbiológica de ricotas de diferentes marcas, comercializadas na região de Alfenas - Minas Gerais. As amostras de 25g de cada queijo foram diluídas, seriadas e incubadas em meios de cultivo específico para análise de coliformes a 35°C termotolerantes utilizando-se a técnica do número mais provável (NMP), contagem total de microrganismos aeróbios mesófilos e contagem total de fungos filamentosos e leveduras, utilizando-se a técnica de plaqueamento em profundidade. As ricotas foram analisadas no dia de fabricação e mantidas à temperatura de refrigeração até a data de vencimento de sua validade para posterior análise. Apenas uma amostra apresentou contagem de coliformes a 35°C termotolerantes dentro dos limites aceitos pela resolução nº 12 de 02 de janeiro de 2001 – Ministério da Saúde. As demais amostras apresentaram, em ambas as datas, altos índices de coliformes a 35°C termotolerantes, microrganismos aeróbios mesófilos, fungos filamentosos e leveduras. Nenhuma amostra apresentou *Salmonella* e *Listéria monocytogenes*. Houve presença de *Staphylococcus* coagulase negativo em todas as amostras. Os resultados obtidos mostraram que, apesar da existência de padrões microbiológicos legais, estes não estão sendo praticados, podendo comprometer a saúde do consumidor.

---

Comitê Orientador: Prof. Dr. João Evangelista Fiorini – UNIFENAS  
(Orientador), Prof. Dr. Jorge Kleber Chavasco – EFOA, Prof<sup>o</sup> Dr<sup>o</sup>  
Roberta Hilsdorf Piccoli do Valle – UFLA



## ABSTRACT

RAIMUNDO, Ivana Cassia. A microbiological evaluation of “Ricota” samples, commercialized in Alfenas county. UFLA 2003. 62f. Dissertation (Master in Food Science).

Ricotta is a by-product of cheese fabrication and is characterized by its high protein content. Its fabrication process consists in the precipitation of whey proteins done by heating associated with acidification. Its fabrication is still a workmanship process and its long handling process is done without the required hygienic care, thus favoring contamination by microorganisms that may cause food intoxication, among other problems. Its low lipid content also characterizes it and explains its common use in diet regimen. In the market for human consumption it may be found fresh, spiced, seasoned, flavored and smoked. However, there is very little scientific research about its microbiological evaluation. This research is aimed at evaluating the microbiological performance of “ricotta cheese” of several commercial brands in Alfenas county of Minas Gerais state. The 25g samples of each cheese brand were solved, ordered and incubated in a specific medium of culture for heat tolerant coliform analysis, using the Most Probable Number (MPN) counting of total mesophyll aerobic microorganism, filamentous fungi and yeast using the deep plating technique. The ricotta cheese samples were analyzed in the day of fabrication and stored, at refrigeration temperature, for future analysis, till the expiring date specified for human consumption. Only one sample presented heating tolerant coliform counting, at 35 C, according to the Brazilian Resolution. 12 of January 02, 2001. The other samples, in both dates presented index of heat tolerant mesophyll aerobic coliform microorganisms, filamentous fungi and yeast higher than those allowed by law. No one sample presented *Salmonella* and *Listeria monocytogenes* contamination. The presence of negative coagulase *Staphylococcus* was verified in all samples. The results showed that legal requirements are not followed and practiced; therefore public health is set at risk.

---

Guidance Committee: Orientador: Prof. Dr. João Evangelista Fiorini – UNIFENAS (Orientador), Prof. Dr. Jorge Kleber Chavasco – EFOA, Profª Drª Roberta Hilsdorf Piccoli do Valle - UFLA

# 1 INTRODUÇÃO

O leite e seus derivados são alimentos consumidos mundialmente devido às suas propriedades nutricionais. Dentre os vários produtos de laticínio encontra-se o queijo. Este é conhecido há mais de 5.000 anos, considerado um produto nobre é produzido e consumido em quase todos os países, tendo excelente valor nutritivo e qualidade organoléptica variada. Existe grande número de variedades de queijo, entre elas a ricota, queijo feito a partir do soro proveniente da coagulação da caseína. É muito utilizada em dietas alimentares.

O mercado do queijo, incluindo todas as categorias, vem crescendo muito, não só pela qualidade e sabor dos diversos produtos, mas também por sua praticidade de uso.

De acordo com dados oficiais, no Brasil são consumidos atualmente em torno de 60 mil toneladas de queijo fresco (Almeida Filho, 1999), contudo, grande número de laticínios atuam na informalidade não entrando nas estatísticas oficiais. Esta prática, condenada pela saúde pública e pelos órgãos oficiais, pode levar à produção de queijos de baixa qualidade, principalmente no que diz respeito à contaminação microbiana, em virtude da falta de orientação, fiscalização e, conseqüentemente, de controle da qualidade do produto.

Assim a qualidade destes produtos é freqüentemente investigada em relação a vários fatores, incluindo o grau de contaminação por microrganismos.

Por ser o leite e seus derivados considerados excelentes meios de cultivo, os microrganismos presentes no ambiente e na microbiota normal do corpo humano, podem contaminar tais produtos em virtude da falta de condições higiênico-sanitárias e, ou, orientação aos manipuladores. Como conseqüência, tais contaminantes, entre os quais alguns patógenos que podem oferecer riscos aos consumidores acarretando graves problemas de saúde pública. A ricota pode

conter microrganismos, devido sua elevada manipulação. Aliado ao fato da quase ausência de trabalhos especificamente com a ricota, este trabalho propôs, quantificar bactérias e fungos, que porventura estejam contaminando este alimento, no início e no final da data de validade.

## 2 REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.1 Leite

O leite é considerado como o alimento humano “mais próximo da perfeição”. Seu excepcional valor nutritivo é devido aos seus principais constituintes: proteínas, carboidratos, gorduras, sais minerais, vitaminas e água (Bishop & White, 1988; Craven & Macauley, 1993). Devido a sua constituição é, também, excelente meio nutritivo para a multiplicação de várias bactérias. Este alimento pode conter microrganismos adquiridos no momento da ordenha ou posteriormente, durante seu manuseio e, ou, processamento. O conhecimento sobre a quantidade e gêneros microbianos do leite pode ser usado no julgamento de sua qualidade sanitária e das condições de sua produção. Tendo a possibilidade de se multiplicarem, os microrganismos podem causar alterações químicas, tais como a degradação de gorduras, de proteínas ou de carboidratos, o que torna o produto inaceitável para o consumo. Além dos microrganismos deterioradores, elevado número de microrganismos pode indicar a contaminação do leite por microrganismos patogênicos. Porém as altas contagens bacterianas nem sempre significam a presença de bactérias patogênicas. Indicam contaminação excessiva ou refrigeração inadequada, ou ainda, condição de armazenamento imperfeita (Bishop & White, 1988; Craven & Macauley, 1993). Devem ser tomadas precauções capazes de reduzir essa eventualidade e de eliminar ou impedir que microrganismos patogênicos entrem em contato com o leite. Certos microrganismos produzem alterações químicas desejáveis na fabricação de produtos lácteos como o leite fermentado, a manteiga e os queijos. Assim sendo, e tendo em vista os fatos acima, torna-se importante o exame intensivo dos tipos de microrganismos encontrados no leite e dos meios pelos

quais eles podem ser avaliados, controlados e empregados para fins benéficos (Bishop & White, 1988; Craven & Macauley, 1993).

São várias as fontes de contaminação por microrganismos no leite: germes naturais do canal mamário, que são eliminados quase que totalmente no início da ordenha, a saúde do gado leiteiro, a limpeza da área de ordenha, a sanificação dos equipamentos, a saúde do pessoal envolvido na ordenha e no processamento do leite (Bishop & White, 1988; Craven & Macauley, 1993).

Os resultados obtidos após análises microbiológicas do leite fornecem informações úteis que refletem as condições sob as quais ele foi obtido e mantido.

A carga microbiológica do leite cru é de extrema importância na qualidade final de produtos lácteos. Leite de baixa qualidade microbiológica não se conserva por longos períodos, mesmo sob refrigeração, devido a sua contaminação, principalmente, por bactérias psicrófilas formadoras ou não de esporos, que, apesar de seu crescimento lento, produzem grandes quantidades de enzimas (lipases e proteases), que rapidamente alteram o produto (Bishop & White, 1988; Craven & Macauley, 1993).

A qualidade insatisfatória do leite produzido no Brasil é um problema crônico, de difícil solução, onde fatores de ordem social, econômico, cultural e até mesmo climático estão envolvidos, e que não têm merecido a devida atenção, apesar do importante papel representado pelo leite na alimentação da população (Bishop & White, 1988; Craven & Macauley, 1993).

## 2.2 Queijos TUDO

Entende-se por queijo o produto fresco ou maturado que se obtém por separação parcial do soro do leite ou leite reconstituído (integral, parcial ou totalmente desnatado), ou de soro lácteos, coagulados pela ação física do coalho, de enzimas específicas, de bactérias específicas, de ácidos orgânicos, isolados ou

combinados, todos de qualidade apta para uso alimentar, com ou sem agregação de substâncias alimentícias e, ou, especiarias e, ou, condimentos, aditivos especificamente indicados, substâncias aromatizantes e matérias corantes (Brasil, 1996).

A indústria de queijos expandiu fortemente no Brasil em relação a década passada. O desenvolvimento bem sucedido desta atividade industrial depende sobretudo de dois princípios básicos como: constante aumento dos padrões produtivos e redução ao mínimo dos prejuízos ocorridos durante a produção e a cadeia de marketing (Taniwaki & Van Dender 1992).

Queijos frescos, fabricados com leite não pasteurizados, mantêm a flora existente no leite, inclusive os agentes patogênicos que possam estar presentes (Riedel, 1986). Fabricados sem muito controle sanitário, a partir de leite cru e muito manipulado por pessoas não conscientes dos hábitos higiênicos necessários, este produto não recebe tratamento com o objetivo de diminuir a carga microbiana e eliminar agentes patogênicos, que poderão causar doenças veiculadas por alimentos (Florentino et al, 1999). A contaminação microbiana de queijos é notadamente relevante considerando que as bactérias enterogênicas e patogênicas como *Staphylococcus aureus*, *Listeria* sp e *Salmonella* sp comumente encontradas em derivados lácteos (Presi et al, 2001).

A limpeza e sanitização na indústria de alimentos são operações primordiais no controle higiênico-sanitário dos alimentos e vêm evitar a contaminação dos mesmos (Thielmann, 1994). Assim como, na fase final da produção, por exemplo durante o envase, onde as embalagens utilizadas para queijo fresco têm como principais funções evitar grandes perdas de umidade e a contaminação microbiológica (Alves, 1992).

### 2.3 Ricota

A ricota é um queijo de origem italiana tradicionalmente produzido nas regiões meridional e central da Itália, sendo atualmente fabricada em diversos países de todo o mundo e tendo recebido várias denominações (Ilardi, 1980).

É conhecida, também, por “queijo de albumina”, por constituir-se basicamente desta e de lactoglobulina, que são os principais componentes protéicos do soro, não coaguláveis pelo coalho. São proteínas facilmente desnaturadas e precipitadas pelo calor e acidificação o que constitui o princípio básico da fabricação da ricota (Furtado & Lourenço Neto, 1994).

A ricota merece atenção especial, em virtude ao seu valor protéico e por constituir-se em alimento leve e de fácil digestão, razão pela qual este queijo é largamente utilizado em dietética. O alto grau de digestibilidade é consequência de sua boa solubilidade no suco gástrico, sendo superior a quase todos os queijos (Panetta, 1975).

Comercializada após o processo de defumação, ricota defumada ou de condimentação, ricota condimentada, a ricota defumada apresenta-se altamente resistente às condições desfavoráveis do ambiente, do transporte e da exposição à venda. O mesmo não ocorre, com a ricota fresca, cuja fabricação é indicada somente nas proximidades dos centros de consumo, pois, possui alto teor de umidade, fácil dessoro durante o transporte e difícil acondicionamento em condições higiênicas. Assim sendo é extremamente problemática a sua conservação (Panetta, 1975).

A composição média esperada da ricota é de 70 a 73% umidade, 4 a 6% gordura e pH entre 4,9 a 5,3 além de não conter sal (Furtado & Lourenço Neto, 1994).

De acordo com os padrões físico-químicos oficiais do Ministério da Saúde (Brasil, 1996), para inspeção e classificação dos queijos no Brasil, a ricota pode ser identificada como um queijo magro e de muita umidade,

contendo menos de 10% de gordura no extrato seco e teor de umidade não inferior a 55%. Entretanto, como são inúmeras as tecnologias de fabricação da ricota, havendo grandes variações de composição dos ingredientes utilizados, pode-se verificar grandes oscilações dos valores médios de seus componentes. Além disto, em muitos casos ocorre a adição de leite integral ao soro para aumentar ligeiramente o rendimento industrial, bem como proporcionar textura mais firme (DIPOA, 1988).

Com relação à microbiologia da ricota, praticamente não existem relatos na literatura à exceção dos ensaios realizados por (Sakate et al., 1999)

#### 2.4 Características do gênero *Salmonella*

*Salmonella sp.* é um microrganismo amplamente difundido na natureza, sendo homem e animais seus principais reservatórios naturais. Trata-se de um patógeno muito envolvido em casos e surtos de doenças de origem alimentar em diversos países.

Jay (2000) menciona que este agente, dentre os bastonetes gram-negativos que causam gastroenterites de origem alimentar, é o mais importante.

A classificação das *Salmonellas*, atualmente, baseia-se na hibridação DNA-DNA. A literatura mostra que ainda não há consenso definitivo. Admite-se que o gênero *Salmonella* apresenta uma espécie única, a *S. entérica* (Germano & Germano, 2001). No entanto, Jay 2000 também menciona a *S. bongori*, bem como a existência de 2324 sorovares de *Salmonella*.

As principais causas consideradas, que levam ao aumento da salmonelose vinculada por alimento, são: aumento de elaboração de produtos em forma de massa; procedimentos inadequados de armazenamentos, que devido às atuais condições de vida são acumulados em excesso; o costume de cada vez mais freqüente de comer produtos crus ou insuficientemente aquecidos; o



aumento do comércio internacional; a diminuição de resistência às infecções devido ao aumento dos níveis de higiene pessoal (Jay, 1994).

Inúmeros surtos de infecção alimentar por *Salmonella* são conhecidos, envolvendo os mais variados tipos de alimentos, principalmente os de origem animal. Os alimentos que comumente servem de veículo da salmonelose ao homem são os ovos, carnes de aves e outros tipos de carnes e seus derivados (Jay, 2000). Nos casos em que estão envolvidos laticínios, comumente há ligação com o consumo de leite cru, leite pasteurizado de forma inadequada e queijos (Franco et al, 1996).

O maior surto, verificado nos Estados Unidos causado por *S. typhimurium*, ocorreu em 1985 atingindo oficialmente 16 mil pessoas, devido ao consumo de leite pasteurizado (Jay, 2000).

No Brasil significativo aumento de *S. enteritidis* ocorreu a partir de 1993, tomando-se desde de 1994, o sorotipo mais freqüente isolado (Jay, 2000).

Presi et al, (2001) descreveram 23 surtos provocados por *S. enteritidis*, durante o período de 1993 a 1997, na região noroeste do estado de São Paulo.

A ocorrência de infecção por *Salmonella* adaptada à espécie humana está diretamente relacionado com a produção de alimentos de origem animal destinados ao consumo humano (Calzada et al., 1984). Em relação à contaminação de queijos por *Salmonella*, Papadopoulou et al. (1993) descreveram que a presença deste patógeno, um dos mais importantes agentes de infecção em produtos lácteos, tem sido adequadamente investigado devido ao seu significado em saúde pública. Entre os derivados lácteos, vários relatos têm comprovado o envolvimento de queijos nas enfermidades veiculadas por alimentos demonstrando a alta freqüência de contaminação destes produtos por microrganismos patogênicos. Comumente tem sido observada a contaminação por coliformes termotolerantes, *Staphylococcus sp*, *Listeria sp*, *Proteus sp* e

*Salmonella* sp. (Papadopoulou et al., 1993; Cerqueira et al., 1994; Carmo et al., 1996).

Apesar da salmonelose ser doença de notificação obrigatória, no Brasil os surtos da doença nem sempre são notificados às autoridades sanitárias, dificultando a real avaliação dos casos ou outros de salmonelose existentes no país, embora casos isolados sejam diagnosticados (Furlanetto et al., 1983).

### 2.5 *Staphylococcus aureus*

Bactérias do gênero *Staphylococcus aureus* ocupam papel destacado na etiologia das infecções intramamárias do gado leiteiro. A espécie *aureus* é considerada patógena primária e tem sido a agente mais frequentemente isolada tanto de infecções clínicas com subclínicas (Watts, 1988).

As espécies coagulase-negativas, comumente isoladas do leite bovino, são considerada patógenos secundários, e em geral, causam reações inflamatórias moderada na glândula mamária (Harmon & Langlois, 1989).

Segundo Carmo (1990), nos últimos cinco anos, aproximadamente 820 pessoas foram intoxicadas e 17 morreram, em Minas Gerais, depois de ingerir alimentos contaminados por enteroxina estafilocócica produzida por *Staphylococcus aureus*.

Apesar da proibição legal imposta à comercialização de queijos frescos e moles elaborados a partir de leite cru no Brasil, a comercialização de queijo tipo minas frescal produzido artesanalmente tem sido realizada abertamente, especialmente nos estados de Minas Gerais e São Paulo (Almeida Filho, 1999).

Nos queijos fabricados de forma artesanal, por pessoas não treinadas, pode ocorrer a contaminação por diversos microrganismos, comprometendo tanto a sua qualidade como a saúde do consumidor. Por este motivo, as práticas de higiênicas devem ser observadas com rigor, para prevenir possível contaminação ou recontaminação do produto. Além disso, por não ser maturado,

é um produto perecível, devendo ser consumido rapidamente após curta estocagem em ambiente refrigerado (Silva & Leitão, 1980).

De acordo com Riedel (1986), os queijos frescos, quando fabricados com leite não pasteurizados mantêm a microbiota existente no leite, inclusive os agentes patogênicos eventualmente presentes.

Melchiades et al. (1993) ressaltam que microrganismos do gênero *Staphylococcus*, presentes em leite cru, podem representar risco à saúde dos consumidores, pelo fato de algumas espécies dessas bactérias produzirem enterotoxinas termoestáveis capazes de provocar toxinose. Os autores ainda citam que esta intoxicação pode ocorrer após ingestão de leite cru ou pasteurizado e seus derivados, nos quais as cepas enterotoxigênicas, encontrando condições favoráveis à multiplicação, produziram enterotoxinas capazes de desencadear severos processos de gastroenterites e diarreias principalmente em crianças e idosos.

Surtos de toxinose são freqüentemente relatados e os causados por *Staphylococcus aureus* são os mais comuns, uma vez que há no alimento condições favoráveis à sua multiplicação. Conseqüente, ocorre a produção de toxinas termoestáveis, que seriam responsáveis pelo quadro clínico. Os sintomas, que podem aparecer dentro de 1,6 horas após a ingestão do alimento, são caracterizados por náusea, vômitos, espasmo abdominal e diarreia. Em casos severos, muco e sangue são observados no vômito e nas fezes. Em adição, a intoxicação estafilocócica pode ser fatal para recém-nascidos e pessoas idosas (Troller, 1971).

## 2.6 *Listeria monocytogenes*

*Listeria monocytogenes* vem sendo reconhecida, nos últimos anos como um dos agentes mais problemáticos em higiene e inocuidade alimentar. Em



Portugal, este microrganismo tem sido encontrado em elevada frequência em queijos (Duarte, 1992, Guerra & Bernardo, 1997).

Segundo Guerra & Bernardo, (1997) verificou que os queijos de pasta mole e semi-mole são os que oferecem melhores condições de sobrevivência e desenvolvimento deste microrganismo. Os queijos de pasta dura normalmente não são referidos como fonte de contágio significativa.

A presença de *Listéria monocytogenes* no queijo é atribuída ao fato de estes serem muitas vezes fabricados com leite cru ou leite submetido a um tratamento térmico equivalente a uma pasteurização baixa, permitindo sua sobrevivência, ou ainda, a contaminação pós-pasteurização (Zottola & Smith, 1991).

*Listeria monocytogenes* é Gram-positiva, psicrotrófica, que se apresenta na forma de bastonetes curtos e regulares. É um microrganismo desprovido de cápsula, não formador de esporos, anaeróbio facultativo e que está associado à infecção veiculada por alimentos. Sua temperatura ótima de crescimento está entre 30° e 37° C, embora seja capaz de multiplicar-se entre 1° e 45° C (Seeliger & Jones, 1986).

Apesar de ser reconhecida como patógeno de importância veterinária, desde 1925, e como agente da listeriose humana, desde 1929, somente na década de 80 foi considerada passível de ser veiculada por alimentos (Uboldi Eiroa, 1990), estando associada a surtos de infecções humanas (Brackett, 1988; Farber & Peterkin, 1991; Emond, 1993; Archer, 1996; Aureli et al., 2000). O primeiro surto de listeriose humana veiculada por alimentos relatada data de 1979, nos EUA, quando 20 pacientes internados apresentaram sintomas, sendo atribuída ao consumo de salada de alface, tomate e salsa (Ho et al., 1986). Outro surto, envolvendo 41 pessoas, foi relatado em 1981, no Canadá, estando relacionado ao consumo de salada de repolho, que encontrava-se contaminada pelo uso de adubo orgânico contendo esterco de ovinos infectados pela bactéria. Também foi

constatado que os repolhos haviam sido mantidos sob refrigeração por tempo prolongado (Schlech III et al., 1983).

Mesmo havendo probabilidade de risco para todos os consumidores, este patógeno é potencialmente mais perigoso para neonatos, prematuros, idosos, gestantes e pacientes com a imunidade comprometida ou propensos a tal (Schuchat et al., 1992; Rocourt, 1994; Almeida, 1999). Este fato, juntamente com o isolamento do microrganismo em alimentos processados, fez com que, sobre esta bactéria, atualmente, concentrem a atenção de indústrias alimentícias, autoridades de Saúde Pública e de pesquisadores em vários países.

Devido à severidade desta infecção, diversos países têm adotado política rigorosa de controle de *L. monocytogenes*. No entanto, este controle é dificultado pelas próprias características da bactéria, como sua natureza psicrófila, tolerância a diversos agentes preservativos e distribuição ubíqua (Schuchat et al., 1992; Rocourt, 1994; Almeida, 1999).

Devido à natureza psicrófila de *L. monocytogenes*, a preocupação tornou-se ainda maior, pois o risco de listeriose aumenta na proporção direta da produção crescente de alimentos frescos e processados, prontos para o consumo, e que usualmente são conservados à temperatura de refrigeração (Schuchat et al., 1992; Rocourt, 1994; Almeida, 1999).

Dentre os alimentos, têm merecido destaque a veiculação da listéria por produtos lácteos e cárneos. Os alimentos lácteos têm sido os veículos de transmissão de listeriose mais comumente relacionados a surtos recentes (Bradshaw et al., 1985). Diversos produtos cárneos, de diferentes espécies animais, foram relatados como fontes de surtos de listeriose (Harrison & Carpenter, 1989).

## 2.7 Coliformes

Os coliformes são freqüentemente utilizados como indicadores higiênico-sanitários, em controle de qualidade de água e alimentos. Sabe-se, contudo, que o grupo coliforme não se comporta de maneira uniforme, no que diz respeito à especificidade de habitat e tempo de sobrevivência em outros ambientes que não o trato intestinal. As bactérias do grupo coliforme se distinguem, termotolerantes e a 35° C os primeiros são encontrados no trato intestinal do homem e de mamíferos, sendo incapazes de persistir por longo tempo em outros ambientes que não nas fezes (ICMSF, 1983).

A contaminação microbiana de queijos assume destacada relevância para a indústria ao se considerar as alterações sensoriais, que pode acarretar nos produtos, bem como o risco de veiculação de agentes de toxinfecções. As bactérias do grupo coliforme são consideradas como principais agentes contaminantes associados à deterioração de queijos, causando fermentações anormais e estufamento precoce dos produtos. Deve-se destacar, também, que a contagem destes microrganismos, sobretudo os de origem fecal, indica as condições de higiene em que os queijos foram processados (Lück, 1987; Jay, 1994).

Quando os queijos frescos são fabricados de forma artesanal, por manipuladores não treinados, pode ocorrer a contaminação por diversos microrganismos, comprometendo tanto a qualidade quanto a segurança da saúde do consumidor. Por este motivo, as práticas higiênicas devem ser observadas com rigor, para prevenir possível contaminação ou recontaminação do produto. Além disso, por não ser maturado o queijo fresco é perecível, devendo ser consumido rapidamente após curta estocagem em ambiente refrigerado (Silva & Leitão, 1980).

A ingestão de queijos com condições inadequadas para consumo pode trazer graves conseqüências para a população, sendo, portanto, um problema de Saúde Pública.

## 2.8 Fungos filamentosos e leveduras

São organismos unicelulares, que obtêm sua alimentação de matéria orgânica inanimada ou nutrem-se como parasitas de hospedeiros. Estão bem difundidos na natureza, estando presentes no solo, ar, água, em matéria orgânica em decomposição ou em outros organismos vivos (Taniwaki & Van Dender, 1991).

Alguns destes fungos são benéficos ao homem, auxiliando na indústria alimentícia como, por exemplo, na maturação de queijos, bem como na indústria farmacêutica, na produção de penicilina entre outros. Outros são prejudiciais, causando doenças em vegetais, humanos e animais e dentro destes grupos há ainda aqueles produtores de micotoxinas, como aflatoxinas, produzidas por espécies de *Aspergillus*. Como os fungos filamentosos, certas leveduras são benéficas, sendo utilizadas na produção de cervejas, vinhos e bebidas alcoólicas em geral, na síntese de certas vitaminas e outros produtos; entretanto, existem aquelas que deterioram alimentos ou provocam doenças nos animais e vegetais (Taniwaki & Van Dender, 1991).

A presença de fungos filamentosos e leveduras viáveis e em índice elevado de contaminação no ar e em alimentos, pode fornecer várias informações, tais como, condições higiênicas deficientes de equipamentos; multiplicação no produto em decorrência de falhas no processamento e, ou, estocagem; matéria-prima com contaminação excessiva (Siqueira, 1995).

Embora o queijo seja excelente substrato para o crescimento fúngico, dadas às condições adequadas de temperatura e umidade, esse crescimento não implica necessariamente, que toxinas tenham sido produzidas (Scott, 1989).

Até recentemente, o crescimento de fungos era considerado indesejável por causa de perdas econômicas devido às descolorações, aparências desagradáveis e perda do valor, contudo, atualmente, uma das mais sérias preocupações, consiste no fato de alguns fungos filamentosos serem capazes de produzir metabólitos tóxicos (Butler, 1974).

Levantamentos da incidência de fungos filamentosos nos queijos têm sido realizados em vários países. De acordo com estudos, as espécies de *Penicillium* capazes de crescer em temperaturas tão baixas quanto  $-2^{\circ}$  a  $10^{\circ}\text{C}$  e de produzir toxinas têm sido os contaminantes mais comuns nos queijos, vindo em seguida as espécies do gênero *Aspergillus* que, também, podem produzir toxinas. A simples remoção das partes contaminadas não garante que as micotoxinas não tenham sido difundidas nos queijos. Outros fungos filamentosos importantes são: *Cladosporium*, *Geotrichum* e *Mucor*. Que podem produzir diferenciação no produto, com perda na sustentável de sua qualidade (Scott, 1989).

O crescimento fúngico no queijo pode ser minimizado por boa sanificação na produção e manuseio em toda a cadeia de produção do alimento, desde o produtor até o consumidor (Bullerman, 1981).



### **3 MATERIAIS E MÉTODOS**

Esse trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Biologia e Fisiologia de Microrganismos da Universidade José do Rosário Vellano - Unifenas.- Campus Alfenas.MG.

#### **3.1 Produto e coleta da amostra**

Para o estudo foram coletadas ricotas, em supermercados da cidade de Alfenas - MG.

Foram adquiridas ricotas de seis marcas diferentes. As amostras foram transportadas para o Laboratório de Biologia e Fisiologia de Microrganismos em caixas isotérmicas providas de gelo e mantidas sob refrigeração (5° a 7°C) até o momento da análise.

#### **3.2 Procedimento de Análise**

As ricotas foram analisadas em dois intervalos de tempo, na chegada da amostra ao Laboratório e no último dia do prazo de validade descritos na Tabela 1. As amostras foram codificadas (A, B, C, D, E e F) e mantidas sob refrigeração (5° a 7°C) até na data de validade.

#### **3.3 Metodologia e técnica de análises microbiológicas**

Todas as metodologias empregadas foram de acordo com o ICMSF (1983) exceto quando mencionado.

**TABELA 1.** Data de fabricação e validade das amostras de ricotas comercializadas na cidade de Alfenas, MG

<b>Amostra</b>	<b>Data de Fabricação</b>	<b>Data de Validade</b>
A	12/06/2001	08/2001
B	14/06/2001	08/2001
C	13/06/2001	08/2001
D	24/06/2001	09/2001
E	11/06/2001	08/2001
F	09/06/2001	08/2001

### **3.3.1 Contagem padrão de bactérias aeróbias mesófilas**

Foram retiradas assepticamente 25 g da amostra e homogeneizadas em 225 mL de água peptonada a 1% (p/v) , em Erlenmayer, e feita as diluições decimais sucessivas de  $10^{-1}$  até  $10^{-6}$ .

Foram incubadas alíquotas de 1 ml das diluições em placas de Petri seguida pela adição ágar padrão para contagem (PCA). Após homogeneização as placas foram incubadas a 35 – 37° C por 48 horas. (Silva et al., 1998).

### **3.3.2 Detecção e quantificação de coliformes a 35° C, coliformes termotolerantes e *Escherichia coli***

Para a quantificação de coliformes, a 35° C, foi empregada a técnica do Número Mais Provável (NMP), usando-se caldo lauril-sulfato-triptose (LST) e séries de três tubos. Estes foram incubados a 35°C por 24 - 48h. A análise de coliformes termotolerantes foi realizada pela transferência de alíquotas das culturas positivas em LST para tubos contendo caldo EC. Em seguida, os tubos foram incubados a 44,5°C por 24h. Alíquotas de tubos positivos em caldo EC

foram estriadas em placas, contendo o meio ágar eosina azul de metileno, segundo Levine, para o isolamento de colônias típicas de *E. coli* que foram identificadas utilizando-se testes bioquímicos empregando galerias do sistema API (Silva et al., 1998).

### 3.3.3 Detecção e quantificação de estafilococos

Aliquotas de 0,1 ml das amostras diluídas foram inoculadas em triplicata em placas contendo ágar Baird-Parker, utilizando-se a técnica de plaqueamento em superfície. Após a inoculação, as placas foram incubadas a 35° C por 48h. Foi avaliado o número de colônias típicas (Silva et al., 1998). Cerca de 5% das colônias típicas e atípicas isoladas foram transferidas para PCA e estocadas para posterior coloração de Gram, testes de coagulase, desoxirribonuclease e fermentação do manitol.

### 3.3.4 Detecção e quantificação de *Salmonella sp*

Foi retirada assepticamente 25 g da amostra e homogeneizada em 225 ml de água peptonada. Após homogeneização, o sistema foi incubado a 35 – 37° C por 24 horas, fase de pré-enriquecimento. Em seguida, foram transferidas do pré-enriquecimento, aliquotas de 10 ml para 90 ml de caldo selenito-cistina e para 90 ml de caldo de enriquecimento tetracionato verde brilhante, as quais foram incubadas a 42,5° C por 24 horas em banho-maria, sendo essa etapa o enriquecimento seletivo.

Do enriquecimento seletivo foram feitas estrias, em meios sólidos: ágar verde brilhante, ágar XLD, ágar para enterobactérias seg. Hektoen, ágar *Salmonella-Shigella*, ágar Rambach (Merck®), incubadas a 37° C por 24 horas.

Transcorrido o período de incubação do plaqueamento seletivo, transferiu-se as colônias suspeitas de *Salmonella*, fazendo-se estrias em superfície e em profundidade nos meios ágar TSI e ágar lisina-ferro. Incubou-se

a 37° C por 24 horas. As colônias suspeitas foram suspensas em solução diluente e inoculadas em galerias do sistema API de identificação (Silva et al., 1998).

### **3.3.5 Detecção de *Listeria monocytogenes***

As amostras foram pesadas e homogeneizadas em porções de 25g, em 225 ml do Caldo Palcam (Merck®), e incubadas a 37°C por 16 à 24h, como enriquecimento prévio.

Após o período de incubação, de cada cultura foram retiradas aliquotas de 1ml, inoculadas em 10ml de Caldo Palcam e, em seguida, incubadas a 37°C por 22 a 24h, como enriquecimento secundário. Posteriormente foi retirada aliquota para plaqueamento em estrias em Ágar Palcam (Merck®). Estas placas foram incubadas a 37°C por 24 a 48h, das quais foram selecionadas 5 colônias que apresentassem características de *Listeria* e inoculadas em tubos contendo Ágar Trypticase Soja-Extrato de Levedo (TSA-YE), incubado-os a 37°C por 24h.

Após o período de incubação, as culturas foram centrifugadas por 10 minutos, a 14.000rpm, para posterior identificação bioquímica pelo sistema Pathalert *Listeria monocytogenes* (Siqueira, 1995).

### **3.3.6 Quantificação de fungos filamentosos e leveduras**

Foram retiradas assepticamente 25 g da amostra, homogeneizadas em 225 ml de água peptonada (1%) e feitas as diluições decimais seriadas. Posteriormente, foram pipetadas aliquotas de 1 ml de cada diluição para placas de Petri, fazendo de cada diluição, placas em duplicatas. Em seguida, foram adicionados em cada placa, 20 ml de ágar batata dextrose acidificado com ácido tartárico, após homogeneização as placas foram incubadas a 20 – 25° C, por 3 a 5 dias (Silva et al., 1998).

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A qualidade dos produtos alimentícios é fator preponderante para a preservação e manutenção da saúde, sendo assim o leite e seus derivados assumem papel importante na alimentação humana, razão pela qual devem manter alto padrão de qualidade. Por ser um alimento completo e de fácil contaminação, a maioria dos microrganismos podem crescer e multiplicar-se no mesmo, onde o grupo coliforme ocupa grande parte da contaminação microbiana em produtos lácteos. As bactérias coliformes são consideradas como os principais agentes contaminantes associados à deterioração de queijos, causando fermentações anormais e estufamento precoce dos produtos (Jay, 1994).

Deve-se destacar, também, que a presença destes microrganismos, sobretudo os de origem fecal, indica as condições de higiene em que os queijos foram processados (Luck, 1987; Jay, 1994).

A presença deste microrganismo em alimentos processados pode ser considerada como indicador de contaminação pós-sanificação e pós-processamento, principalmente, em queijos tipo ricota, que sofrem acidificação e altas temperaturas (90-95°C) em seu processamento. Sendo assim, os resultados apresentados nas Tabelas 2 e 3 mostram que 83,3% das amostras continham Número Mais Provável por grama de coliformes a 35° C e termotolerantes elevados, maior que 2.400NMP/g, indicando falhas nas condições higiênico-sanitárias durante o processamento, como observado por Sakate et al. (1999). Estes autores, ao analisarem microbiologicamente amostras de ricotas comercializadas no município de Belo Horizonte – MG, constaram que 88,9% delas continham NMP/g de coliformes a 35° C elevado, superior a 500 NMP/g, número este, segundo o Ministério da Saúde, potencialmente causadores de toxinoses, com risco potencial à saúde pública (Brasil, 1987).

**TABELA 2.** Contagem global de coliformes, a 35° C, em amostras de ricotas comercializadas na cidade de Alfenas, MG

<b>Amostra</b>	<b>Data de Fabricação NMP/g*</b>	<b>Data de Validade NMP/g</b>
<b>A</b>	$9,0 \times 10^2$	$9,2 \times 10^3$
<b>B</b>	$2,4 \times 10^5$	$2,1 \times 10^5$
<b>C</b>	$4,1 \times 10^5$	$3,9 \times 10^5$
<b>D</b>	$7,6 \times 10^5$	$6,3 \times 10^5$
<b>E</b>	$3,7 \times 10^6$	$3,2 \times 10^5$
<b>F</b>	$1,9 \times 10^5$	$1,2 \times 10^5$

\*(NMP) Número Mais Provável por grama

**TABELA 3.** Contagem total de coliformes termotolerantes, em amostras de ricotas, comercializadas na cidade de Alfenas, MG

<b>Amostra</b>	<b>Data de Fabricação NMP/g*</b>	<b>Data de Validade NMP/g</b>
<b>A</b>	$8,4 \times 10^2$	$7,1 \times 10^2$
<b>B</b>	$3,3 \times 10^5$	$3,4 \times 10^5$
<b>C</b>	$5,5 \times 10^4$	$2,9 \times 10^5$
<b>D</b>	$6,3 \times 10^5$	$5,1 \times 10^4$
<b>E</b>	$2,8 \times 10^6$	$2,4 \times 10^4$
<b>F</b>	$2,1 \times 10^5$	$2,3 \times 10^5$

\*(NMP) Número Mais Provável por grama

Apenas a amostra A apresentou-se dentro dos padrões estabelecidos pela Resolução nº 12 de 02 de janeiro de 2001, do Ministério da Saúde, que estabelece número inferior a  $10^3$  coliformes/g. (Brasil, 1987).

Na Itália, Santis et al. (1991), caracterizando a ricota produzida na região do Alto Lazio, constataram que as amostras não possuíam bons padrões microbiológicos, sugerindo a não regulamentação da produção de ricota pelo governo.

A distribuição das contagens de coliformes a  $35^\circ\text{C}$  e termotolerantes (NMP/g) também foi descrita por Oliveira et al., (1998), em que análises de amostras de queijos Minas frescal e mussarela apresentaram níveis de contaminação de coliformes a  $35^\circ$ , de  $10^3\text{UFC/g}$  em 15 amostras de queijo Minas frescal (46,9%) e em 3 amostras de mussarela (15%), sendo esta diferença estatisticamente significativa.

Luck (1987) destacou a importância da contagem dos coliformes, para avaliar a ocorrência de contaminações durante o processamento de produtos lácteos em geral, considerando que estes microrganismos, comumente encontrados no leite cru, são destruídos pelo calor da pasteurização. Neste sentido, o alto índice de contaminação verificado no presente trabalho poderia ser atribuído à contaminação pós-processamento.

Rodrigues et al. (1995) constataram que 89,2% das amostras de queijo Minas frescal comercializadas em Viçosa – MG, continham coliformes, a  $45^\circ\text{C}$ , acima de  $10^3$  permitidas pelo Ministério da Saúde. A maioria destas amostras, contudo, eram provenientes de fabricação artesanal, o que, certamente, contribuiu para as concentrações encontradas. Com relação às ricotas pode-se considerar o contrário, pois foram produzidas em laticínios, embaladas e comercializadas em balcões refrigerados de forma higiênica.

As análises efetuadas, na presente investigação, evidenciaram a ocorrência de falhas no controle de qualidade de ricotas elaboradas por algumas

fábricas de laticínios. Considerando os resultados obtidos, evidenciou-se que a qualidade microbiológica do queijo tipo ricota está comprometida.

Com relação ao número de microrganismos presentes na data de fabricação, comparativamente aos presentes na data de vencimento dos produtos analisados é possível, que algumas discrepâncias sejam devido à adição de produtos em temperatura baixa, à diminuição de  $A_w$  e, ou, crescimento fastigioso dos microrganismos em temperatura de geladeira, uma vez que os produtos analisados foram mantidos a 4°C, que representa a temperatura média de refrigeração, durante todo o período envolvido no processamento. Entretanto, estas são apenas possibilidades, pois o mesmo não ocorreu em todas as amostras.

Na Tabela 4 encontram-se os resultados de contagem padrão de bactérias aeróbias mesófilas, na data de fabricação e na validade, mostrando que não houve mudanças substanciais nos resultados. Esta Tabela mostra que 100% das amostras encontram-se comprometidas, segundo a resolução nº 12 de janeiro de 2001, do Ministério da Saúde, que estabeleceu um número de tolerância até  $10^4$  (Brasil, 1996). A contagem padrão em placas tem sido usada como indicador da qualidade higiênico-sanitária dos alimentos, fornecendo também idéia sobre seu tempo útil de prateleira. A presença desse tipo de contaminante em grande parte indica matérias-primas excessivamente contaminadas, limpeza e desinfecção de superfícies inadequadas, higiene inadequada dos manipuladores, condições inadequadas do tempo/temperatura na produção ou conservação dos alimentos ou combinação destas circunstâncias.

Um ponto interessante foi observado que houve diminuição do número de microrganismos na data de vencimento em algumas amostras, provavelmente em virtude de ressecamento durante a armazenagem pela menor atividade de água, como anteriormente observado.



**TABELA 4.** Contagem total de bactérias aeróbias mesófilas heterotróficas em amostras de ricotas comercializadas na cidade de Alfenas, MG

Amostra	Data de Fabricação UFC (g)*	Data de Validade UFC (g)
A	$6,9 \times 10^4$	$1,2 \times 10^5$
B	$2,4 \times 10^8$	$2,0 \times 10^4$
C	$7,1 \times 10^8$	$1,2 \times 10^8$
D	$1,8 \times 10^6$	$3,1 \times 10^7$
E	$2,3 \times 10^8$	$2,2 \times 10^8$
F	$2,4 \times 10^7$	$2,4 \times 10^8$

\* (UFC) Unidade Formadora de Colônias por grama

De acordo com a Tabela 5, as amostras submetidas às análises de fungos filamentosos e leveduras apresentaram-se 100% contaminadas, tanto na data de fabricação como no término da vida útil do produto. As amostras, contendo bactérias psicrotróficas, fungos e leveduras acima dos padrões oficiais, produzem alterações organolépticas e sensoriais no produto, que podem ir desde a formação de ranço hidrolítico por enzimas lipolíticas, putrefação por enzimas proteolíticas até a descoloração ou formação de manchas na superfície do produto que, reduzem o tempo de prateleira, sendo rejeitados pelos consumidores (Furtado, 1991). Segundo RDC nº 12 de 02 de janeiro de 2001, foi abolido da legislação a contagem de fungos filamentosos e de levedura.

De acordo com Sakate et al. (1999), das ricotas comercializadas no Município de Belo Horizonte 95% obtiveram contagens superiores  $10^5$  UFC/g de fungos filamentosos e leveduras, dados que confirmam a falta de higiene na fabricação.

**TABELA 5.** Contagem global de fungos filamentosos e leveduras em amostras de ricotas comercializadas na cidade de Alfenas, MG. Na data de fabricação e data de validade

<b>Amostra</b>	<b>Data de Fabricação UFC (g)*</b>	<b>Data de Validade UFC (g)</b>
<b>A</b>	$3,7 \times 10^3$	$9,0 \times 10^2$
<b>B</b>	$2,5 \times 10^8$	$1,4 \times 10^4$
<b>C</b>	$5,4 \times 10^8$	$5,4 \times 10^7$
<b>D</b>	$1,3 \times 10^6$	$1,1 \times 10^5$
<b>E</b>	$4,3 \times 10^5$	$3,2 \times 10^4$
<b>F</b>	$4,2 \times 10^4$	$3,1 \times 10^2$

\* (UFC) Unidade Formadora de Colônias por grama

É importante observar que as amostras apresentavam datas de validade elevadas, como 30, 60 e 90 dias, o que vai contra às normas sanitárias vigentes para produtos lácteos. Isto poderia sugerir a adição de conservantes nos produtos analisados.

O crescimento de fungos em queijos é problema comum durante a maturação, tanto para varejista quanto para consumidores, durante a estocagem, seja queijo refrigerado ou não. Uma das mais sérias preocupações atuais, consiste no fato de alguns fungos filamentosos e leveduras serem capazes de produzir metabólitos tóxicos, denominados micotoxinas (Papadopoulou et al., 1993). Entretanto, o queijo constitui excelente substrato para o crescimento fúngico, mas pobre substrato para produção de micotoxinas (Taniwaki & Van Dender, 1991), provavelmente pela ausência de precursores metabólicos para a biossíntese das mesmas.

Os dados da Tabela 6 demonstram que as ricotas analisadas apresentaram presença de estafilococos, sendo todos coagulase negativos. Alguns estafilococos são causadores de intoxicações alimentares em virtude de produzirem potentes enterotoxinas (Furtado & Lourenço Neto, 1994).

**TABELA 6.** Contagem total de estafilococos coagulase positivos e negativos em amostras de ricotas comercializadas na cidade de Alfenas, MG. Na data de fabricação e data de validade

Amostra	Data de Fabricação	Data de Validade
A	$1,06 \times 10^6$	$9,8 \times 10^5$
B	$9,6 \times 10^5$	$8,4 \times 10^5$
C	$1,01 \times 10^6$	$7,1 \times 10^5$
D	$1,2 \times 10^6$	$1,3 \times 10^5$
E	$2,6 \times 10^5$	$1,9 \times 10^5$
F	$1,1 \times 10^6$	$1,0 \times 10^6$

De acordo com Dack (1964), que vêm trabalhando independentemente com queijos envolvidos em casos de toxínose, é muito freqüente a presença destas bactérias nos queijos tanto artesanais como industrializados. Isto ocorre desde que tal processamento ocorra em contato direto com o homem, uma vez que tanto estafilococos coagulase positivas como negativas podem ser isolados com certa freqüência da boca, nariz e mãos.

De acordo com a revisão feita por Pinto et al. (1996), em Ribeirão Preto, São Paulo, 92,3% das amostras de queijos Minas, apreendidas pela Vigilância Sanitária da prefeitura local, entre 1989 e 1990, estavam em desacordo com os

padrões físico-químicos e microbiológicos, sendo encontrados *S. aureus*, *Bacillus cereus*, *Salmonella* sp., clostrídios redutores, coliformes, bolores e leveduras. Exames realizados por Rodrigues et al. (1995), com queijos Minas frescal, coletados de bares, supermercados, padarias e feiras livres da cidade de Viçosa, Minas Gerais, sendo 78,5% provenientes de fazenda e 21,5% de laticínios, revelaram os seguintes níveis médios de contaminação:  $3,2 \times 10^7$  UFC/g para *Staphylococcus* sp. e  $2,8 \times 10^9$  UFC/g para mesófilos totais. Esses resultados indicaram contaminação dos queijos extremamente elevada, sendo que 100% continham níveis elevados de *Staphylococcus* sp. Na cidade do Rio de Janeiro, Rodrigues et al. (1995), relataram que 38,4% das amostras de queijo Minas frescal examinadas, apresentavam *S. aureus*. Franco & Almeida (1992), num estudo feito com queijo parmesão ralado, na cidade de Niterói, Rio de Janeiro, encontram contagem de *S. aureus*, variando de  $1,5 \times 10^2$  a  $3,1 \times 10^3$  UFC/g nas amostras analisadas de queijo ralado, vendido a granel, sugerindo, como causa das contaminações por esta bactéria, as condições inadequadas de manipulação, limpeza e desinfecção.

Em estudos recentes, Corbia et al., (1998) relataram, além da presença de *S. aureus* (22,22%), a ocorrência de *Micrococcus* sp. (33,33%) em queijo Minas frescal. A presença de *Micrococcus* sp. em queijo torna-se de importância, pelo fato dessa bactéria pertencer ao grupo das bactérias deteriorantes de alimentos (Pardi et al., 1996). Os *Micrococcus* sp. são bactérias oportunistas, consideradas como flora contaminante da pele, podendo facilmente contaminar os alimentos (Genigeorgis, 1989; Baird-Parker, 1990; Murray et al., 1998).

Nas análises efetuadas os estafilococos foram coagulase negativa, o que se constitui dado importante, em virtude dos mesmos poderem causar deterioração, ou mesmo produção de enterotoxinas como levantado por Pereira et al. (2000). Esses autores comentaram que: “raros são os estudos sobre o crescimento de estafilococos coagulase negativos em alimentos, sendo que uma

possível razão da quase não evidencia destes em pesquisas de alimentos envolvidos em surtos, poderia estar relacionada com a incapacidade ou inabilidade de seu crescimento em substrato alimentício”.

Entretanto, deve-se considerar que, sabidamente, espécies coagulase negativas, podem alcançar alimentos uma vez que, tanto homens como animais são portadores usuais destas estirpes. Portanto, há de se enfatizar a pesquisa de estafilococos coagulase negativas ou positivas em alimentos, bem como seu potencial como produtor de enterotoxinas, além do crescimento e multiplicação nos mesmos.

Em Minas Gerais, estado tradicionalmente produtor de queijos, a situação agrava-se ainda mais, pois, de acordo com os estudos de Delazari et al. (1978), cerca de 40% dos rebanhos leiteiros do sudeste de Minas apresentam mamite, que pode comprometer substancialmente a qualidade do leite.

Além deste ponto de contaminação, somam-se às transmissões do patógeno ao leite pelo homem, durante e após a ordenha, as precárias condições higiênicas na fabricação do queijo e a permanência do produto, desde a produção até sua comercialização, em temperaturas que permitem o crescimento de estafilococos, bem como de outros patógenos (Delazari et al., 1978).

A ausência de *Salmonella* sp e *Listeria monocytogenes*, em todas as amostras, pode ter ocorrido pela maior sensibilidade térmica destes microrganismos, uma vez que as ricotas são submetidas a altas temperaturas durante a fabricação 90 a 95° C, além do fato de não haver relato na literatura da presença destes microrganismos na microbiota normal do corpo humano. Outro fator importante, que justificaria a ausência destes dois microrganismos nas ricotas analisadas, poderá ser, a provável presença de colicinas específicas inibidoras de *Listeria* e *Salmonella*, uma vez que a carga microbiana de coliformes nos produtos analisados foi bastante elevada.

## **5 CONCLUSÕES**

- 1. As ricotas mantidas sobre refrigeração adequada no período de controle não tiveram sua microbiota alterada.**
- 2. Apesar da legislação vigente, produto de baixa qualidade microbiológica é encontrado no mercado.**

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS



ALMEIDA FILHO, E. S. **Características microbiológicas do queijo Minas “frescal”, produzido artesanalmente e comercializado no Município de Poços de Caldas/MG.** 1999. Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual Paulista. Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal, SP.

ALVES, R. M. V. Embalagens para queijos: principais tipos de controle de qualidade. *Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes*, Juiz de Fora, v. 47, n. 282/284, p. 11, jul./dez. 1992.

ARCHER, D. P. *Listeria monocytogenes: the science and police.* *Journal of Food Control*, n. 7, p. 181-182, 1996.

AURELI, P.; FIORUCCI, G. C.; CAROLI, D.; MARCHIARO, G.; NOVARA, O.; LEONE, L.; SAMASO, S. An outbreak off febrile gastroenteritis associated with corn contaminated by *Listeria monocytogenes*. *New England Medicine*, Boston, v. 342, n. 17, p. 1230-1241, Apr. 2000.

BAIRD-PARKER, A. C. The Staphylococci: an introduction. *Journal of Applied Bacteriology*, Oxford, p. 1-8, 1990. Supplement 1.

BISHOP, J. R.; WHITE, C. H. Estimation of potential shelflife of pasteurized fluid milk utilizing bacterial numbers and metabolites. *Journal of Food Protection*, Ames, v. 48, n. 8, p. 663-667, Aug. 1988.

BRACKETT, R. Presence and persistence of *Listeria monocytogenes* in food and water. *Food Technology*, Chicago, v. 42, n. 4, p. 162-164, 178, Apr. 1988.

BRADSHAW, J. C.; PEELER, J. T.; CORWIN, J. J.; HUNT, J. M.; LARKIN, E. P.; TWEDT, R. M. Thermal resistance of *Listeria monocytogenes* in milk. *Journal of Food Protection*, Ames, v. 48, n. 9, p. 743-745, Sept. 1985.

BRASIL. Ministério da Agricultura e do Abastecimento. **Portaria nº 146, de 07 de abril de 1996.** Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Queijos. Brasília: Ministério da Agricultura e do Abastecimento, 1996.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria Nacional de Vigilância Sanitária. **Portaria nº 1, de 28 de janeiro de 1987.** Seção 1. Brasília, DF, p. 2197-2200, 1987.

BULLERMAN, L. B. Public health significance of molds and mycotoxins in fermented dairy products. *Journal Dairy Science*, Champaign, v. 64, n. 12, p. 2439-2452, Dec. 1981.

BUTLER, W. H. Aflatoxin. In: PURCHASE, I. F. H. (Ed.). *Mycotoxins*. S. I. : Elsevier Scientific Publishing Company, 1974.

CALZADA, C. T.; NEME, S. N.; IRINO, K.; KANO, E.; DIAS, A. M. G.; FERNANDEZ, S. A.; VAZ, T. M. I.; PESSOA, G. V. A. Sorotipos de *Salmonella* identificados no período de 1977-1982, no Instituto Adolfo Lutz, São Paulo, Brasil. *Revista do Instituto Adolfo Lutz*, São Paulo, v. 44, n. 1, p. 1-8, jan./jun. 1984

CARMO, L. S. do. Staphylococcal food poisoning in Belo Horizonte, MG (Brasil). *Revista de Microbiologia*, São Paulo, v. 21, n. 4, p. 320-323, 1990.

CARMO, L. S. do; VIEIRA, C. A.; REIS, D'ARC, P. dos. *Staphylococcus aureus* and *Salmonella enteritidis* present in food implicated in food poisoning. *Revista de Microbiologia*, São Paulo, v. 27, n. 2, p. 122-125, 1996.

CERQUEIRA, M. M. O. P.; SOUZA, M. R.; FONSECA, L. M. Surto epidêmico de toxinfecção alimentar envolvendo queijo tipo minas frescal em Pará de Minas. *Arquivo Brasileiro de Veterinária e Zootécnica*, Belo Horizonte, v. 46, n. 6, p. 723-728, nov./dez. 1994.

CORBIA A. C. G.; NASCIMENTO, M. G. F.; OLIVEIRA, C. Z. F.; NASCIMENTO, E. R.; LIGNON, G. B. Ocorrência de *Staphylococcus aureus* coagulase positiva em queijo Minas frescal. In: CONGRESSO LATINO AMERICANO DE MICROBIOLOGIA E HIGIENE DE ALIMENTOS, 5.; SIMPÓSIO BRASILEIRO DE MICROBIOLOGIA DE ALIMENTOS, 6. , 1998, Águas de Lindóia. *Anais. . . . Águas de Lindóia*, 1998. p. 123.

CRAVEN, H. M.; MACAULEY, B. J. Microorganisms in pasteurized milk after refrigerated storage. III. Effects of milk processor. *Australian Journal of Dairy Technology*, Victoria, v. 47, n. 1, p. 50-55, May 1993.

DACK, G. M. Microbial food poisoning. *Food Technology*, Chicago, v. 12, n. 12, p. 1904-1914, Dec. 1964.

DELAZARI, I.; LEITÃO, M. F. F.; GERALDINI, A. M.; EIROA, M. N. U.; VALLE, J. L. E. Desenvolvimento de *Staphylococcus aureus* e produção de



enterotoxina em queijos tipo Minas. **Coletânea do Instituto de Tecnologia dos Alimentos**, Campinas, v. 9, p. 163-174, 1978.

DIPOA. Escola de Veterinária. Universidade Federal de Belo Horizonte. Belo Horizonte, 1988.

DUARTE, M. H. **Incidência de *Listeria monocytogenes* e Avaliação da qualidade higiênico-sanitária do queijo fresco português**. 1992. Dissertação (Mestrado em Saúde Pública Veterinária) - Faculdade de Medicina Veterinária Universidade Técnica de Lisboa, Lisboa, Portugal.

EMOND, E. A ribosomal DNA fragment of *Listeria monocytogenes* and its use as a genus specific probe in an aqueous phase hybridization assay. **Applied Environmental Microbiology**, Washington, v. 59, n. 1, p. 2690-2697, Jan. 1993.

FARBER, J. M.; PETERKIN, L. *Listeria monocytogenes*, a food-borne pathogen. **Microbiology Reviews**, Washington, v. 53, n. 3, p. 476-511, Sept. 1991.

FLORENTINO, E. R.; MARTINS, R. S. Características microbiológicas do “queijo de coalho” produzido no estado da Paraíba. **Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 13, n. 59, p. 43-48, jan./fev. 1999.

FRANCO, B. D. G. M.; LANDGRAF, M. **Microbiologia dos alimentos**. São Paulo: Atheneu. 1996. 182 p.

FRANCO, R. M.; ALMEIDA L. E. F. Avaliação Microbiológica de Queijo Ralado, Tipo “Parmesão”, comercialização em Niterói, RJ. **Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 6, v. 21, p. 33-36, nov./dez. 1992.

FURLANETTO, S. M. P.; CERQUEIRA-CAMPOS, M. L.; IARIA, S. T. Pesquisa de *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Clostridium perfringens* e *Salmonella* em queijo frescal, vendido em supermercados do município de São Paulo. In: CONGRESSO LATINO AMERICANO DE MICROBIOLOGIA, 9.; CONGRESSO BRASILEIRO DE MICROBIOLOGIA, 12. , São Paulo, 1983. Programa-Resumos. . . . São Paulo, 1983.

FURTADO, M. M. **A arte e a ciência do queijo**. São Paulo: Globo, 1991. (Publicações Globo Rural).

FURTADO, M. M.; LOURENÇO NETO, J. P. M. Tecnologia de queijos. **Manual técnico para a produção industrial de queijos**. São Paulo: Pipemar, 1994.

GENIGEORGIS, C. A. Present sntate of knowledge on staphylococcal intoxication. **Internacional Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 9, n. 4, p. 327-360, Dec. 1989.

GERMANO, P. M. L.; GERMANO, M. I. S. **Higiene e vigilância sanitária de alimentos**. São Paulo: Varela, 2001. 269 p.

GUERRA, M.; BERNARDO, F. Ocorrence of listeria spp in traditional chases from alentijo, portugal. In: **WORLD CONGRESS ON FOOD HYGIENE, 1997, The Hague. Procoeedings...** The Hague, 1997.

HARMON, R. J. Langlois, Mastitis due to coagulase-negative species. **Staphylococcus Species. Agri-Practice**, London, v. 10, n. 1, p. 29-3, 1989.

HARRISON, M. A.; CARPENTER, S. L. Survival of large populations of *Listeria monocytogenes* on chicken breasts processed using moist heat. **Journal of Food Protection**, Ames, v. 52, n. 6, p. 376-378, June 1989.

HO, J. L.; SHANDS, K. N.; FRIEDLAND, G.; ECKIND, P.; FRASER, D. W. An outbreak of type 4B *Listeria monocytogenes* infection involving patients from eight Boston Hospitals. **Archives of International Medicine**, Chicago, v. 146, n. 3, p. 520-524, Mar. 1986.

ILARDI, S. Ricotta: a produd in need of controle. **Revista Della Societa Italiana di Scienza dell Alimentazione**, Pinerolo, v. 9, n. 6, p. 441-444, 1980.

INTERNATIONAL COMISSION ON MICROBIOLOGICAL SPECIFICATIONS FOR FOODS - ICMSF. **Microrganisms in foods. I. Their significance and methods enumerations**. 3. ed. Toronto: University of Toronto Press, 1983.

JAY, J. M. **Microbiologia moderna de los alimentos**. 3. ed. Zaragoza: Acribia, 1994.

JAY, J. M. **Modern food microbiology**. 6. ed. Maryland: Aspen, 2000. 679 p.

LÜCK, H. Control de la calidad de la industria lactológica. In: ROBINSON, R. K. **Microbiologia lactologica**. Zaragoza: Acribia, 1987. v. 2.

MELCHIADES, L. E. A. et al. Produção de enterotoxinas por *Staphylococcus* isolados de mastite subclínica bovina. *Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes*, Juiz de Fora, v. 48, n. 288, p. 80, out./dez. 1993.

MURRAY, P. R.; ROSENTHAL, K. S.; KOBAYASHI, G. S.; PFALLER, M. A. *Medical microbiology*. 3. ed. Mosby-Year Book, 1998. p. 175-188.

OLIVEIRA, C. A. F.; MORENO, J. F. F.; MESTIERI, L.; GERMANO, P. M. L. Características físico-químicas e microbiológicas de queijos minal frescal e mussarela, produzidos em algumas fábricas de laticínios do Estado de São Paulo. *Higiene Alimentar*, São Paulo, v. 12, n. 55, p. 31-35, maio/jun. 1998.

PANETTA, J. C. Ricota, produto dietético ideal. *Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes*, Juiz de Fora, v. 30, n. 177, p. 13-14, jan./fev. 1975.

PAPADOPOULOU, C.; MAIPA, V.; DIMITRIJOU, D.; PAPPAS, C.; VOUTSINAS, S. L.; MALATOU, H. Behaviour of *Salmonella enteridis* during the manufacture, ripening, and storage of feta cheese made from unpasteurized ewe's milk. *Journal of Food Protection*, Ames, v. 56, n. 1, p. 25-8, Jan. 1993.

PARDI, M. C.; SANTOS, I. F.; SOUZA, E. R.; PARDI, M. S. Aspectos higiênico-sanitários da carne. In: *Ciência, higiene e tecnologia de carne*. Goiânia: UFG, 1996. p. 265-440.

PEREIRA, M. L.; PEREIRA, J. L.; SERRANO, A. M.; BERGDOLL, M. S. *Estafilococcus*: Até onde sua importância em Alimentos? *Higiene Alimentar*, São Paulo, v. 44, n. 68/69, p. 32-40, jan./fev. 2000.

PINTO, P. S. A.; GERMANO, M. I. S.; GERMANO, P. M. L. Queijo Minas: Problema emergente da vigilância sanitária. *Higiene Alimentar*, São Paulo, v. 10, n. 44, p. 22-35, jul./ago. 1996.

PRESI, J. T. M.; GRACIANO, R. A. S.; ALMEIDA I. A. Z.; LIMA S. I.; RIBEIRO A. K.; CARVALHO, I. S.; LIMA, M. Queijo Minas tipo frescal Artesanal e Industrial: Qualidade Microscópica, Microbiologia e Tese de Sensibilidade aos Agentes antimicrobianos. *Higiene Alimentar*, São Paulo, v. 15, n. 83, p. 63-70, abr. 2001.

RIEDEL, G. *Controle Sanitário dos Alimentos*. São Paulo: Atheneu, 1986.

ROCOURT, J. *Listeria monocytogenes*: the state of the science. **Dairy Food and Environmental Sanitation**, Des Moines, v. 14, n. 2, p. 70-82, 1994.

RODRIGUES, F. T. et al. Características microbiológicas de queijo Minas frescal comercializado em Viçosa-MG. In: CONGRESSO NACIONAL DE LATICÍNIOS, 8., 1995, Juiz de Fora. **Anais...** Juiz de Fora, 1995. p. 233-235.

SAKATE, R. I.; SANTOS, F. L.; BRANDÃO, S. C. C. Características microbiológicas de ricota fresca comercializada no município de Belo Horizonte – MG. [S. l. : s. n], 1999.

SANTIS, D. de; CANGANELLA, F.; CONTINI, M.; ANELLI, G. Characterization of Alto Lazio Ricotta Cheese. Caratterizzazione delle Ricotte dell'Alto Lazio. **Scienza e Técnica Lattiero – Casearia**, Parma, v. 42, n. 3, p. 183-191, 1991.

SCHLECH III, W. F.; LAVIGNE, P. M.; BORTOLUCCI, R. A. et al. Epidemic listeriosis. Evidence for transmission by food. **New England Journal of Medicine**, Boston, v. 308, n. 4, p. 203-206, Apr. 1983.

SCHUCHAT, A.; DEEVER, K.; WENGER, J. D. Role of food in sporadic listeriosis. I. case control study of dietary risk factors. **Journal of the American Medical Association**, Alexandria, v. 267, n. 15, p. 2041-2045, June 1992.

SCOTT, P. M. Mycotoxigenic fungal contaminants of cheese and other dairy products. In: EGMOND, H. P. Van (Ed.). **Mycotoxins in dairy products**. Barking Essex: Elsevier Science Publisher, 1989.

SEELIGER, H. P. R.; JONES, D. Genus *Listeria* Pirie 1940. In: HOLT, J. G. (Ed.) **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology**. Baltimore: Williams & Wilkins, 1986. v. 2.

→ SILVA, C. A. M.; LEITÃO, M. F. de F. Influência da temperatura de armazenamento na proliferação microbiana e no tempo de vida útil de queijo tipo "Minas Frescal". In: CONGRESSO BRASILEIRO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS, 4., 1980, Rio de Janeiro. **Programa Oficial, Resumos...** Rio de Janeiro: Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia de Alimentos, 1980. p. 186.

SILVA, M. C. D.; HOFER, E.; TIBANA, A. Incidency of *Listeria monocytogenes* in cheese produced in Rio de Janeiro, Brazil. **Journal of Food Protection**, Ames, v. 61, n. 3, p. 354-356, Mar. 1998.

- ⇒ SIQUEIRA, R. S. de. **Manual de microbiologia de alimentos**. Rio de Janeiro: EMBRAPA. Centro Nacional de Pesquisa de Tecnologia Agroindustrial de Alimentos, 1995.
- TANIWAKI, M. H.; VAN DENDER, A. G. F. Bolors produtores de toxinas em queijos: ocorrência e significado. **Coletânea do Instituto de Tecnologia dos Alimentos**, Campinas, v. 21, n. 2, p. 187-200, jul./dez. 1991.
- TANIWAKI, M. H.; VAN DENDER, A. G. F. Occurrence of toxigenic molds in Brazilian cheese. **Journal of Food Protection**, Ames, v. 55, n. 3, p. 187-191, Mar. 1992.
- THIELMANN, C. Sanitização: elemento prioritário da indústria de laticínios. **Revista Leite & Derivados**, São Paulo, v. 3, n. 14, p. 78-82, jan./fev. 1994.
- TROLLER, J. A. Effect of water activity on enterotoxin production and growth of *Staphylococcus aureus*. **Applied Microbiology**, Washington, v. 21, n. 3, p. 435-439, 1971.
- UBOLDI EIROA, M. N. *Listeria monocytogenes* - características, ocorrência e desenvolvimento em alimentos. **Coletâneas do Instituto de Tecnologia dos Alimentos**, Campinas, v. 20, n. 1, p. 13-22, jan./jun. 1990.
- WATTS, J. L. Etiological agents of Bovine. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v. 16, n. 1, p. 41-66, Jan. 1988.
- ZOTTOLA, E. A ; SMITH, L. B. Pathogenes im chese food microbiology. **Food Microbiology**, London, v. 8, n. 3, p. 171-182, Sept. 1991.