

# ANÁLISE MICROBIOLÓGICA DE AMOSTRAS COLETADAS EM LATICÍNIOS PRODUTORES DE QUEIJOS DE MANTEIGA (REQUEIJÃO NORDESTINO) ESTABELECIDOS NA REGIÃO DE FEIRA DE SANTANA, BA.

**Jecicléa Souza Carvalho<sup>1</sup>; Elinalva Maciel Paulo<sup>2</sup>; Suzi de Almeida Barboni<sup>3</sup>; Ludmilla Teresa Ferreira de Lima Silva<sup>4</sup>**

1-Bolsista FAPESB, Graduanda em Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Feira de Santana, e-mail: [jecicleascarvalho@hotmail.com](mailto:jecicleascarvalho@hotmail.com)

2 – Orientadora: Departamento de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Feira de Santana, e-mail: [elinalvamaciel@yahoo.com.br](mailto:elinalvamaciel@yahoo.com.br)

3- Docente: Departamento de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Feira de Santana, e-mail: [suziavbarboni@gmail.com](mailto:suziavbarboni@gmail.com)

4-Graduanda em Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Feira de Santana, e-mail: [ludmillateresa@hotmail.com](mailto:ludmillateresa@hotmail.com)

**PALAVRAS-CHAVE:** segurança alimentar, queijo nordestino, avaliação microbiológica.

## INTRODUÇÃO

Queijo de manteiga, também conhecido como requeijão do Nordeste é um tipo de queijo cuja produção é restrita à região nordestina (AQUINO, 1983). A sua fabricação e comercialização são atividades importantes para a economia regional, são desenvolvidos por pequenos produtores da zona rural, sendo largamente consumidos pela população local (VENTURA, 1987). O pH final deste queijo fica em torno de 5,5, sendo considerado um produto de média acidez (FRANCO; LANDGRAF, 2008). Esta característica além de outras é propícia para a proliferação de muitas bactérias causadoras de infecção e/ou produtoras de metabólitos causadores de intoxicação ou processos alérgicos de origem alimentar nos seres humanos (CÂMARA et al., 2002). Como representante das bactérias patogênicas podem ser citadas, os Estafilococos coagulase positiva, *Escherichia coli* que pertence ao grupo de coliformes termotolerantes e *Salmonella* spp.

## METODOLOGIA

Foi coletada mensalmente por um período de cinco meses uma amostra de requeijão tipo barra, em um laticínio situado na região de Feira de Santana, (perfazendo um total de cinco amostras neste laticínio, representando, portanto, amostras representativas). No ato da coleta as amostras foram imediatamente acondicionadas em embalagens estéreis, sendo imediatamente conduzida ao Laboratório de Microbiologia Aplicada a Saúde pública – LAMASP, onde foram realizadas análises microbiológicas de Coliformes a 45° C/g, Estafilococos coagulase positiva e pesquisa de *Salmonella* sp., seguindo a Instrução Normativa SDA nº62, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, de 26 de agosto de 2003.

1. Contagem de coliformes totais e coliformes a 45° C/g – método tubos múltiplos (NMP): A partir de diluições  $10^{-1}$  a  $10^{-3}$  em água peptonada a 0,1% foram inoculadas porções de 1mL de cada diluição em três séries de tubo contendo caldo lauril sulfato triptose, contendo no seu interior tubo de Durham invertido. Estes tubos foram incubados a 35. °C por 48h. Após o período de incubação foi realizado a leitura. Como os resultados nesta etapa deram negativos, não se prosseguiu com os testes confirmativos para ambas as análises.

2. Contagem de Estafilococos coagulase positiva: Foi utilizada a diluição  $10^{-1}$ , da qual 0,1 mL foi semeada na superfície de dez placas contendo ágar Baird-Parker (acrescido de

telurito de potássio a 3% e solução de ovo a 50%). Para cada amostra, o inoculo foi espalhado com o auxílio da alça de Drigasly, as placas foram invertidas e incubadas a 35° C durante 48h. A partir das colônias típicas foram realizados os testes de confirmação procedendo as provas de catalase e coagulase.

3.0 Coloração de Gram:Preparou-se o esfregaço e realizou-se a coloração seguindo as seguintes etapas: coração com solução de cristal de violeta por dois minutos; retirada a solução, cobriu-se o esfregaço com lugol por um minuto; a lâmina passou por filete de água; descoloração com álcool por trinta segundos; nova passagem da lâmina por filete de água; coração com safranina por trinta segundos; última passagem da lâmina por água. Seca a lâmina, esta foi analisada no microscópio.

3.1 Prova da catalase: Com auxílio de alça de platina e bastão de vidro retirou-se uma alíquota do cultivo em ágar nutriente, que foi transferida para uma lâmina de vidro contendo uma gota de peróxido de hidrogênio a 3%. Misturou-se o inoculo ao peróxido e foi observada a reação.

3.2 Prova da coagulase:Em um tubo de ensaio utilizou-se 0,2 ml de solução salina, logo após com auxílio de alça de platina estéril, foi transferida uma alíquota do cultivo em ágar nutriente, em seguida, adicionou-se 0,2 ml de plasma de coelho, observando-se a presença ou não de coágulos após 1h e após 24 h incubados a 35°C.

4. Pesquisa de *Salmonella* spp.:25 g de cada amostra foi transferida para frascos contendo 225 mL de caldo de pré-enriquecimento e incubados a 35° C durante 24h. Posteriormente, foi realizado o enriquecimento seletivo: 1 mL de cada amostra foi transferido para 1 tubo, contendo Tetracionato ,incubados a 35° C durante 24h. O plaqueamento diferencial foi realizado a partir dos tubos incubados, semeando através de estrias uma alçada do caldo Tetracionato na superfície do ágar XLD e Hektoen.

4.1 Teste Kligler: As colônias suspeitas retiradas de meios de cultura seletivos foram transferidas para o Ágar Nutriente para propiciar melhor crescimento. Em seguida, essas colônias foram inoculadas no Ágar Kligler através de picada profunda e estriamento na superfície inclinada do bisel.Sendo incubadas a 35°C por 18 a 24 horas.

#### 4.2 Teste IMViC

4.2.1 Teste do indol: Colônias positivas provenientes do teste Kligler foram inoculadas com picada no meio de cultura SIM. Em seguida incubadas a 36°C por 24h.Após esse período foi adicionado o reagente de Kovac's aos tubos, para a verificação da produção do indol.

4.2.2 Teste VM-VP: Colônias suspeitas para o crescimento de *Salmonella* nos meios seletivos, e no Kligler foram inoculadas em duplicata no caldo Vermelho de Metila e Voges-Proskauer, sendo incubadas a 35°C por 48h. Após o período de incubação em um tubo, para cada colônia, foram adicionadas 5 gotas do corante Vermelho de Metila (teste VM). Em outro tubo correspondente a mesma colônia, foi adicionada 0,6 mL de solução de  $\alpha$ -naphthol 5% e, em seguida, 0,2mL de solução de hidróxido de potássio 40% (testeVP).

4.2.3 Teste Citrato:Colônias suspeitas para o crescimento de *Salmonella* nos meios seletivos, e no Kligler foram inoculadas através de picada e estriamento na superfície inclinada do bisel no meio Agar CitratoSimmons.Sendo incubadas a 35°C por 18 a 24 horas.

4.3 Teste da Urease: Colônias suspeitas para o crescimento de *Salmonella* nos meios seletivos, e no Kligler foram inoculadas em tubos contendo Caldo Uréia, sendo incubados em estufa a 35°C por 24 h.

4.4 Descarboxilação da Lisina: Colônias suspeitas para o crescimento de *Salmonella* nos meios seletivos, e no Kligler cultivadas no meio Agar Nutriente foram inoculadas com picada profunda e estriamento na superfície inclinada do bisel. O meio então foi acrescido de vaselina estéril. Sendo incubadas a 35°C por 18 a 24 horas.

4.5 Desaminação da Fenilalanina: Colônias suspeitas para o crescimento de *Salmonella* nos meios seletivos, e no Kligler, cultivadas em meio Agar Nutriente foram inoculadas por estriamento. Sendo incubadas a 35°C em estufa por 18 a 24 horas. Após esse período, adicionou-se 3 gotas de cloreto férrico a 10%.

4.6 Teste Sorológico (Soro polivalente anti- Salmonella): Em uma lâmina limpa e desengordurada misturou-se 50 µl da suspensão bacteriana da cultura confirmada para *Salmonella* nos testes bioquímicos, em 100 µl do soro polivalente. Agitou-se a lâmina delicadamente por cerca de 1 minuto e observou-se a reação de precipitação.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

**Tabela 1:** Resultados das análises microbiológicas das amostras do queijo manteiga

Amostras	NMP/g de Coliformes Totais	NMP/g de coliformes a 45°C	<i>Salmonella</i> a 25 g	Estafilococos coagulase positiva
1	<3	<3	ausente	3,2 x 10
2	<3	<3	ausente	1,6 x 10 <sup>3</sup>
3	<3	<3	presente	1,4 x 10 <sup>2</sup>
4	<3	<3	ausente	<10 <sup>2</sup>
5	<3	<3	ausente	<10 <sup>2</sup>

As análises para coliformes totais são baseadas na portaria nº146 de 07 de março de 1996 do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Os resultados obtidos encontram-se abaixo do valor estabelecido para esta legislação. Da mesma forma as análises para coliformes 45°C encontram-se em conformidade com a legislação quando comparadas aos valores para queijos de média umidade, encontrando valores abaixo do estabelecido pela RDC nº12 de 02 de janeiro de 2001 da ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária).

De acordo com a RDC nº12 de 02/01/2001, para queijos de média umidade, as amostras identificadas como 1, 3, 4 e 5 estão abaixo do limite máximo estabelecido por essa legislação para contagem de Estafilococos coagulase positiva, dessa forma, estão conforme o padrão estabelecido. Porém a amostra 2 ultrapassou esse limite que é de 10<sup>3</sup> UFC/g. Dessa

forma o laticínio em estudo, não está de acordo com a legislação em se tratando de Estafilococos coagulase positiva.

A pesquisa para *Salmonella* spp. nas amostras do queijo manteiga indicaram ausência nas amostras 1, 2 4 e 5. Na amostra 3, apresentou resultados coerentes a presença de *Salmonella* spp., dessa forma o laticínio em estudo está em desacordo com a RDC nº 12/2001 (ANVISA); Vale ressaltar, que essa contaminação pode ser resultado de contaminação cruzada, já que não foi identificada a presença de coliformes a 45°C, cuja fonte principal é a mesma de *Salmonella*.

Como pode ser observada a partir dessas análises, a fabricação do queijo de manteiga no laticínio em estudo, não esta condizente com as boas práticas de fabricação e manipulação, por apresentar patógenos que representam perigo à saúde do consumidor.

## REFERÊNCIAS

AQUINO, F.T.M. **Produção de queijo de coalho no Estado da Paraíba : acompanhamento das características físico-químicas do processamento**, 1983. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos). João Pessoa: Universidade Federal da Paraíba, 1983.

BRASIL. Ministério da Agricultura. Portaria nº 146, de 7 de março de 1996. **Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Queijos**. .Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília, 02 jan.2001.

BRASIL, Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº. 12, de 02 de janeiro de 2001. **Regulamento Técnico sobre os Padrões Microbiológicos para Alimentos**. Diário Oficial da União, Brasília, DF, 10 jan. 2001.

CÂMARA, S.A.V. et al. **Avaliação microbiológica de queijo tipo minas frescal artesanal, comercializados no mercado municipal de Campo Grande, Mato Grosso do Sul**. *Revista Higiene Alimentar*, v.16, n.101, p.32-36, 2002.

FRANCO, B, D. M.G.; LANDGRAF, M. **Microbiologia dos alimentos**. São Paulo: Editora Atheneu, 2008.

VENTURA, R.F. **Requeijões do Nordeste: tipos e fabricações**. *Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes*, Juiz de Fora, v. 42, n. 254, p. 3-21, 1987. In: NASSU, et al. **Diagnóstico das condições de processamento e caracterização físico-química de queijos regionais e manteiga no Rio Grande do Norte**. Fortaleza: Embrapa Agroindústria, Tropical, 2003.