



QUANTIFICAÇÃO DE *Staphylococcus* sp. NO PROCESSAMENTO DO QUEIJO COLONIAL PRODUZIDO EM AGROINDÚSTRIA FAMILIAR DO RIO GRANDE DO SUL - BRASIL.

Carine Machado Viana, Bolsista de Iniciação Científica (ULBRA);

A. P. L., Aluna do PPG Doenças Infecciosas e Parasitárias (ULBRA);

K. L. M., Aluna de Graduação do Curso de Medicina Veterinária (ULBRA);

J. M. B., Técnica do Laboratório de Microbiologia Veterinária (ULBRA);

C. P. Professor Co-Orientador (ULBRA);

Cristina Bergman Zaffari, Professora Orientadora (ULBRA).

RESUMO

O queijo de produção artesanal, denominado no Sul do Brasil como colonial, é um produto de grande aceitação, consumo e produção. Rotineiramente, o leite utilizado para produção não é submetido ao tratamento térmico adequado. O produto final apresenta alto teor de umidade e não há um tempo mínimo de maturação estabelecido. Estes fatores favorecem a contaminação e proliferação de micro-organismos oferecendo risco ao consumidor. A intoxicação causada por *Staphylococcus* pode ser apontada como uma das doenças transmitidas por alimento com expressiva notificação, sendo *Staphylococcus aureus* a espécie mais envolvida em surtos de toxinfecção alimentar. Este fenômeno ocorre devido à sua capacidade de produzir toxinas nos alimentos. Embora a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) considere as espécies de *Staphylococcus* coagulase positivo como únicos produtores de enterotoxinas, tal capacidade já foi comprovada por espécies coagulase negativo. O objetivo deste trabalho foi a quantificação de *Staphylococcus* sp. nas diferentes etapas de produção do queijo colonial. A etapa de produção que apresentou a maior média de contagens foi o leite cru, no entanto, este valor esteve dentro de níveis considerados seguros quanto à produção de enterotoxinas, uma vez que são necessárias contagens a partir de 10^5 micro-organismos /ml ou g. para que haja a produção da toxina. A partir dos resultados desta pesquisa é possível afirmar que, nas amostras analisadas, o *Staphylococcus* coagulase positivo não representou um risco para a saúde do consumidor.

PALAVRAS-CHAVE: queijo colonial, agricultura familiar, *Staphylococcus* spp.

INTRODUÇÃO

A agroindústria familiar de pequeno porte produtora de queijos possui grande relevância na construção de um modelo de desenvolvimento regional equilibrado associado à sua importância social, econômica e ambiental. No Sul do Brasil, destacam-se iniciativas dos agricultores familiares na busca da inserção nos circuitos locais e regionais de produção-distribuição de produtos artesanais de origem animal reforçada pelas políticas públicas de estímulo à implantação de agroindústrias familiares (PREZOTTO et al., 2002).

A importância da agroindustrialização é ainda maior no Rio Grande do Sul, onde estas atividades estão presentes e circula um grande volume desses produtos, destacando-se o queijo colonial. Este produto atrai consumidores em um movimento de *turn of quality* onde junto com a busca de uma alimentação saudável e a preocupação com processos limpos de produção também há a revalorização de alimentos produzidos de forma artesanal, trazendo a “identidade territorial” marcada pela herança de gerações passadas ressaltando o conteúdo simbólico e cultural (GOODMAN, 2003).

O queijo de produção artesanal, denominado no Sul do Brasil como colonial, é um produto de grande aceitação, consumo e produção. Rotineiramente, o leite utilizado para produção não é submetido ao tratamento térmico adequado, o produto final apresenta alto teor de umidade e não há um tempo mínimo de maturação estabelecido. Estes fatores favorecem a contaminação e proliferação de micro-organismos oferecendo risco ao consumidor (SCHIMITT, et al. 2011).

A intoxicação causada por *Staphylococcus* pode ser apontada como uma das doenças transmitidas por alimentos com expressiva notificação, sendo *Staphylococcus aureus* a espécie mais envolvida em surtos de toxinfecção alimentar. Este fenômeno ocorre devido à sua capacidade de produzir toxinas nos alimentos. Embora a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) considere as espécies de *Staphylococcus* coagulase positivo como únicos produtores de enterotoxinas, tal capacidade já foi comprovada por espécies coagulase negativo (CARMO et al., 2002 ; LAMAITA, 2005).

Elevados índices de *Staphylococcus aureus* ocorrem em queijos, tanto no Brasil (BORGES et. al., 2008) como em outros países sendo a terceira causa mais comum de intoxicação alimentar (ACCO et. al., 2003; NORMANNO et. al., 2005), incluindo cepas de estafilococos enterotoxigênicos. Por isso, o queijo ocupa lugar de destaque entre os

produtos lácteos envolvidos em surtos de doenças de origem alimentar, veiculando principalmente *Staphylococcus* sp. (VERAS et al., 2003).

Em função do risco à saúde pública que sua presença representa em alimentos, estabeleceu-se, em diversos países, inclusive no Brasil (Resolução RDC N° 12, de 2 de Janeiro de 2001), a obrigatoriedade de sua pesquisa e enumeração, como parte das ações de fiscalização sanitária de órgãos governamentais. Posteriormente, outras espécies produtoras de enterotoxinas e de coagulase, tais como *Staphylococcus hyicus* e *Staphylococcus intermedius*, foram identificadas e, inclusive, surtos de intoxicação alimentar já foram atribuídos a essas duas espécies (CARMO et. al, 2002; BORGES et. al, 2008). O objetivo deste trabalho foi a quantificação de *Staphylococcus* sp. Isolados nas diferentes etapas de produção do queijo colonial.

MATERIAIS E MÉTODOS

No período entre setembro de 2014 a setembro de 2015, foram coletadas amostras nas diversas etapas de produção do queijo colonial produzido de forma artesanal, sendo estas: leite cru, coalhada, produto em maturação e produto acabado. As amostras foram coletadas em propriedade de produção familiar na região de Teutônia no Estado do Rio Grande do Sul.

Foram coletadas aproximadamente 200 gramas (g/mL) de cada amostra e acondicionadas em sacos plásticos ou frascos de coleta previamente esterilizados e mantidos em temperaturas de refrigeração desde o momento da coleta até a execução das análises. O produto acabado coletado foi amostra pronta para o consumo.

As amostras foram mantidas refrigeradas em caixas isotérmicas até o momento das análises, sendo no máximo 2 horas. As análises ocorreram no Laboratório de Microbiologia de Alimentos do Hospital Veterinário da Universidade Luterana do Brasil.

Foram coletadas um total de 53 amostras, sendo 14 de leite cru, 11 de coalhada, 14 produto em maturação e 14 de produto acabado.

A contagem de *Staphylococcus* sp. seguiu a Instrução Normativa nº 62 do Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (BRASIL, 2003) com modificações. Foram processados 25 mL de leite cru e 25 gramas dos demais produtos, adicionadas em 225mL de solução salina peptonada 0,1% e homogeneizadas por aproximadamente 60 segundos em "stomacher" para obtenção da diluição 10^{-1} e a seguir diluições sucessivas 10^{-2} , 10^{-3} .

10^{-4} , 10^{-5} e 10^{-6} . Foram inoculados 0,1 mL de cada uma destas diluições em Agar *Baird-Parker* e realizado o espalhamento em superfície (“*pour on*”) com auxílio da alça de *Drigalski*. As placas foram incubadas a 37°C por 48 horas.

Após o término do período de incubação, foram selecionadas as placas que continham colônias típicas (negras brilhantes com anel opacas, rodeadas por um halo claro) e atípicas. Três colônias típicas e atípicas foram semeadas em Agar Sangue para identificação da hemólise e posterior prova da coagulase. O resultado final foi obtido através da soma das colônias típicas e atípicas confirmadas pelas provas bioquímicas e expresso em ufc/mL ou ufc/g.

RESULTADOS E DISCUSSÕES

Os resultados das análises microbiológicas das etapas de produção do queijo colonial artesanal e o número de isolados, por etapa, estão demonstrados na Tabela 1.

Tabela 1- Médias e número de isolados *Staphylococcus* coagulase positiva e *Staphylococcus* coagulase negativa em amostras das etapas de produção do queijo colonial artesanal produzido em uma propriedade da agricultura familiar da região de Teutônia – RS.

| Etapa | Quantificação de <i>Staphylococcus</i> coagulase positiva (média) | Nº de isolados de <i>Staphylococcus</i> coagulase positiva | Nº de isolados <i>Staphylococcus</i> coagulase negativa |
|---------------------|---|--|---|
| Leite cru | $1,2 \times 10^3$ (UFC/mL) | 30 | 04 |
| Coalhada | 3×10^2 (UFC/g) | 01 | 03 |
| Queijo em maturação | $3,6 \times 10$ (UFC/g) | 10 | - |
| Produto acabado | $8,5 \times 10$ (UFC/g) | 05 | 07 |

A etapa de produção que apresentou a maior média de contagens foi leite cru. No entanto, este valor esteve dentro de níveis considerados seguros quanto à produção de enterotoxinas, uma vez que são necessárias contagens a partir de 10^5 micro-organismos /ml ou gramas para que haja a produção da toxina (SANTANA et. al, 2010).

Ainda é possível verificar que houve diminuição das médias de contagens após o tratamento térmico de pasteurização mostrando a eficácia do processo e cuidados higiênicos nas demais etapas e a adequada execução das Boas Práticas de Fabricação.

Segundo, Rapini et. al, (2005), o manipulador é uma das principais vias de contaminação dos alimentos com *Staphylococcus* coagulase positivo. No homem,

Staphylococcus pode estar presente no conduto nasal, olhos, garganta, região subungueal, pele e outros. As falhas higiênico-sanitárias durante a manipulação do alimento podem ser fontes de contaminação, dando origem a surtos de doenças transmitidas por alimentos.

Outras pesquisas demonstraram resultados diferentes, como as realizadas por Schimitt et. al, (2011), onde todas as amostras de queijo colonial analisadas estavam impróprias para consumo por apresentarem contaminação por *Staphylococcus* coagulase positivo superior à estabelecida pela legislação vigente onde o limite padrão para contagem de *Staphylococcus* coagulase positivo em queijos é 5×10^3 UFC/g (BRASIL, 2011). No interior do Estado de São Paulo, Salotti et. al. (2006) identificaram 86,7% de amostras de queijo colonial impróprias para consumo.

Em relação ao número de isolados de *Staphylococcus* coagulase positivo e negativo, faz-se necessária a identificação dos genes produtores de enterotoxinas através da realização de técnicas adequadas.

CONCLUSÃO

A partir dos resultados desta pesquisa é possível afirmar que nas amostras analisadas, o *Staphylococcus* coagulase positivo não representou um risco a saúde do consumidor.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACCO, M., et. al. Identification of multiple strains of *Staphylococcus aureus* colonizing nasal mucosa of food handlers. **Food Microbiology**, v. 20, n. 5, p. 489-493, 2003.

BRASIL. Instrução Normativa nº 62, de 26 de agosto de 2003. **Oficializa os Métodos Analíticos Oficiais para Análises Microbiológicas para Controle de Produtos de Origem Animal e Água**. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br>> Acesso em: 11 agosto de 2015.

BRASIL. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. Departamento de Inspeção de Produtos de Origem Animal. Instrução Normativa Nº57, de 15 de dezembro de 2011. Estabelece critérios adicionais para elaboração de queijos artesanais. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**. Brasília, Seção I, 16 de dezembro de 2011.p. 23.

BRASIL. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. Departamento de Inspeção de Produtos de Origem Animal. Instrução Normativa Nº 30, de 07 de agosto de 2013. Estabelece critérios adicionais para elaboração de queijos artesanais. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**. Brasília, Seção I, 08 de agosto de 2013.

BRASIL. Ministério da Saúde. Resolução RDC n.12, de 02 de janeiro de 2001. Aprova o Regulamento Técnico sobre Padrões Microbiológicos para Alimentos. **Diário Oficial da União Federativa do Brasil**, DF, 10 janeiro 2001. Seção 1, n.7-E, p.45-53

BORGES, M. F. et. al. Perfil de contaminação por *Staphylococcus* e suas enterotoxinas e monitorização das condições de higiene em uma linha de produção do queijo coalho. **Ciência Rural**, v. 38, n.5, p.1431-1438, 2008.

CARMO, L.S. et. al. Food poisoning due to enterotoxigenic strains of *Staphylococcus* present in Minas cheese and raw milk in Brazil. **Food Microbiology**, v. 19, p. 9-14, 2002.

GOODMANN, D. The “turn quality” and alternative food practices: reflections and agenda. **Journal of Rural Studies**, v. 19, 2003.

LAMAITA, H.C. et. al. Contagem de *Staphylococcus* sp. e detecção de enterotoxinas estafilocócicas e toxina da síndrome do choque tóxico em amostras de leite cru refrigerado. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 57, n. 5, p. 702-709, 2005.

NORMANNO, G. et al. Occurrence, characterization and antimicrobial resistance of enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* isolated from meat and dairy products. **Int. J. Food Microbiol.** v.115, p.290-296, 2007.

PREZOTTO, L.L. Qualidade ampla: referência para a pequena agroindústria rural inserida numa proposta de desenvolvimento regional descentralizada. In: LIMA, D.M.A.; WILKINSON, J. **Inovação nas tradições da agricultura familiar**. Brasília: CNPQ/Paralelo, v.15, p. 285-300, 2002.

RAPINI, L.S, et al. Presença de *Staphylococcus* spp. produtoras de enterotoxinas e da toxina da síndrome do choque tóxico em manipuladores de queijo de cabra. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 57, n. 6, p. 825-829, 2005.

SANT’ANA, A.S., et al. Qualidade microbiológica de águas minerais. **Cienc. Tecnol. Aliment.** v.23, p.190-194, 2003.

SCHIMITT, C.I., et. al. Contaminação do queijo colonial de produção artesanal comercializado em mercados varejistas do Rio Grande do Sul. **Veterinária Not.** Uberlândia, v.17, n.2, p. 111-116, 2011.

VERAS, J.F. et. al. A study of the enterotoxigenicity of coagulase-negative and coagulase-positive staphylococcal isolates from food poisoning outbreaks in Minas Gerais, Brazil. **International Journal of Infectious Diseases**, v. 12, p. 410-415, 2008.