

Ocorrência de *Escherichia coli* e *Staphylococcus* sp. em queijos do tipo Minas Frescal comercializados em feiras livres e supermercados no Oeste do Paraná

RESUMO

As intoxicações alimentares ocorrem devido a multiplicação de microrganismos patogênicos em diferentes tipos de alimentos, sendo o queijo um dos principais relacionados com essa enfermidade. A indústria adota as Boas Práticas de Fabricação (BPF), que consistem em um sistema de controle de qualidade, que visa garantir a segurança alimentar. Quando a produção do queijo ocorre de forma artesanal, nem sempre são observadas as BPF e os controles higiênico-sanitários recomendados, colocando em risco a saúde do consumidor. O objetivo deste estudo foi verificar a presença de *Escherichia coli* e bactérias do gênero *Staphylococcus* em queijos tipo Minas Frescal, comercializados em feiras livres e supermercados do Oeste do Paraná. Foram analisadas quinze amostras de queijos, sendo seis amostras formais/industrializadas, e nove oriundas de produtores informais/artesanais. Foi possível observar que 86,66% das amostras se apresentaram acima do valor estabelecido para coliformes termotolerantes, e 73,33% do total das amostras se mostraram contaminadas com *E. coli* (sete amostras de produtores informais e quatro das amostras de produtores formais). Duas amostras formais e cinco amostras informais se apresentaram acima dos limites de contaminação por *Staphylococcus* estabelecidos pela RDC n° 12 da ANVISA, classificadas como impróprios para o consumo humano. Estes resultados evidenciam possíveis falhas no controle de qualidade, falta de condições higiênico-sanitárias durante as etapas de produção, e/ou após o processamento, por meio do manuseio inadequado, tratamento térmico ineficiente, refrigeração insuficiente, ou uso de leite de má qualidade.

PALAVRAS-CHAVE: Enterotoxinas; intoxicação estafilocócica; coliformes termotolerantes; queijo artesanal.

Débora Diana Scher

debora_scher@hotmail.com

Pontifícia Universidade Católica do Paraná,
Campus Toledo, Toledo, Paraná, Brasil.

Ana Paula Ferreira de Lima

anapferreiralima@hotmail.com

Pontifícia Universidade Católica do Paraná,
Campus Toledo, Toledo, Paraná, Brasil.

Paulo Tadeu Figueira

paulo@univel.br

Centro Universitário Univel, Campus
Cascavel, Cascavel Paraná, Brasil.

Jaqueline Hoscheid

jaqueline.hoscheid@gmail.com

Escola de Ciências da Vida, Curso de
Farmácia, Pontifícia Universidade Católica
do Paraná, Campus Toledo, Toledo, Paraná,
Brasil.

INTRODUÇÃO

A indústria adota as Boas Práticas de Fabricação (BPF), que consistem em um sistema de controle de qualidade, visando garantir a segurança alimentar no processo de industrialização, obtendo dessa forma, um produto seguro e de boa qualidade. De acordo com o Regulamento de Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal - RIISPOA, os queijos devem ser inspecionados, por órgão governamental, em todas as fases, começando pela propriedade rural, onde o leite ou o queijo caseiro é obtido, até as indústrias e os locais onde são expostos a comercialização (BRASIL, 2017). Contudo, quando a produção do queijo ocorre de forma artesanal, nem sempre são observadas as BPF e os controles higiênico-sanitários recomendados, colocando em risco a saúde do consumidor (SENGER; BIZANI, 2011).

Queijos são veículos frequentes de patógenos devido ao alto teor de umidade (50 a 62%), baixa acidez, riqueza em nutrientes e sofrer frequente manipulação. Além disso, não são embalados a vácuo, permitindo que liberem soro, tornando o ambiente propício a multiplicação microbiana (GRANDI, 2007), com destaque para o crescimento de *E. coli*, *Staphylococcus aureus*, bactérias mesófilas aeróbicas, bolores e leveduras (SALVADOR *et al.*, 2001). Esses fatores reduzem o prazo de validade deste alimento, para aproximadamente 7 dias, sob refrigeração de até 8 °C (PERRY, 2004; MARTINS, 2001).

Entre as contaminações encontradas em queijos Minas Frescal se destacam os coliformes totais (coliformes com crescimento a 35 °C) e os termotolerantes (coliformes com crescimento a 45 °C), estes são considerados bioindicadores mais utilizados para a verificação das condições de higiene dos alimentos. Os coliformes termotolerantes apresentam a capacidade de realizar a fermentação da lactose com produção de gás a 44,5 °C, e o principal representante deste grupo é a *E. coli* (GASPAROTTO; ROCHA; GRECELLÉ, 2008).

A bactéria *E. coli* tem forma de bacilo, não-esporulada, Gram-negativa, anaeróbia facultativa e fermentadora de açúcares. A *E. coli* apresenta muitas estirpes, desde formas comensais até formas patogênicas, e coloniza o intestino da maioria dos animais de sangue quente, inclusive o homem, onde são encontradas formas comensais do microrganismo (ALVES, 2012). Por ser um membro da microbiota intestinal, *E. coli* pode ser encontrada nas fezes de todos os indivíduos e animais, o que a torna passível de ser utilizada como base de testes para verificar contaminações fecais em água e alimentos (TRABULSI; ALTERTHUM, 2008).

Os *Staphylococcus* pertencem à família *Micrococcae*, e apresentam resultado positivo para a prova da catalase. São cocos Gram-positivos, com diâmetro de aproximadamente 0,5 a 1,5 µm, imóveis, não-esporulados e geralmente não-encapsulados. Essas bactérias podem apresentar-se em diversas formas, que vão desde isolados, aos pares, em cadeias curtas, ou agrupados irregularmente, com aspecto semelhante a um cacho de uvas (CASSETTARI; STRABELLI; MEDEIROS, 2005).

Staphylococcus são bactérias mesófilas, ou seja, multiplicam-se entre 25-40 °C, produzem enterotoxinas entre 10-46 °C. Estas bactérias são tolerantes a concentrações de 10 % a 20 % de NaCl e a nitratos. Em relação ao pH,

Staphylococcus aureus proliferam na faixa de 4,0 a 9,8, com pH ótimo entre 6,0 e 7,0 (DIAS *et al.*, 2016).

A intoxicação alimentar estafilocócica é atribuída à ingestão de enterotoxinas produzidas e liberadas pelas bactérias durante sua multiplicação, em diferentes tipos de alimentos, sendo o queijo um dos principais alimentos relacionados com essa enfermidade. Essas enterotoxinas agem no intestino, ativando o peristaltismo, causando sintomas gastrointestinais como náusea, vômito, cefaleia, dores abdominais, diarreia e em alguns casos desidratação (JAY, 2005).

Os sintomas aparecem aproximadamente trinta minutos após a ingestão, e perduram por um dia. Mesmo não sendo considerada uma doença grave, em pessoas idosas, imunossuprimidas e crianças de pouca idade podem ser fatais (SCHERRER *et al.*, 2004; FERREIRA *et al.*, 2010).

As enterotoxinas estafilocócicas são proteínas extracelulares de baixo peso molecular, hidrossolúveis e resistentes à ação de enzimas proteolíticas do sistema digestivo, permanecendo ativas após a ingestão. Outra característica importante é sua termoestabilidade, sendo capaz de resistir a tratamentos térmicos, como a pasteurização e a ultrapasteurização (BORGES *et al.*, 2008a).

Neste contexto, o presente estudo, objetivou verificar a presença e quantificar *Escherichia coli* e as bactérias do gênero *Staphylococcus* em queijos tipo Minas Frescal, produzidos de forma artesanal, comercializados em feiras livres, e queijos produzidos de forma industrial e comercializados em supermercados do Oeste do Paraná.

MATERIAIS E MÉTODOS

COLETA DE MATERIAIS

As coletas e análises laboratoriais foram realizadas entre os meses de fevereiro e abril de 2017. Os procedimentos laboratoriais foram realizados de acordo com técnicas recomendadas por Santana *et al.* (2008) apud Silva *et al.* (2001).

Foram coletadas quinze amostras de queijos tipo Minas Frescal em diferentes cidades da região Oeste do Paraná: Marechal Cândido Rondon, Toledo e Cascavel. Sendo seis formais/industrializados, seguindo padrões de inspeção, e comercializados em supermercados, e nove informais/artesanais, comercializado em feiras livres da região.

As amostras adquiridas foram transportadas ao laboratório de microbiologia da Pontifícia Universidade Católica do Paraná, refrigeradas em caixas térmicas. No laboratório, as amostras foram submetidas à limpeza externa das embalagens com álcool 70% para remoção dos contaminantes, logo em seguida, alíquotas de até 50 g foram retiradas e manipuladas no interior de capela de fluxo laminar.

PESQUISA DE *Escherichia coli*

Realizou-se a metodologia do número mais provável (NMP) para coliformes conforme descrito por Silva *et al.* (2001), em que alíquotas de 25 g de cada amostra foram transferidas para Erlenmeyers contendo 225 mL água peptonada, e

posteriormente incubadas por 24 horas a 37 °C (diluição 10⁻¹). Após o período de incubação, as amostras foram diluídas (10⁻² a 10⁻³), e inoculados 1 mL em Caldo Lauril Sulfato Triptose (LST), incubados a 37±0,5 °C por 24±2 horas. Após incubação, tubos com produção de gás foram considerados positivos. Os tubos negativos foram reincubados por mais 24±2 horas, para nova observação. Todos os experimentos foram realizados em triplicata.

Uma alçada dos tubos que apresentaram resultados positivos frente ao teste LST, foi transferida para tubos contendo Caldo *E. coli* (EC), os quais foram incubados por 24±2 horas a 45,5±0,2 °C em banho-maria, sendo observado, posteriormente, a turvação com produção de gás.

As amostras positivas nos tubos contendo Caldo EC, foram semeadas em placas de Ágar meio brilhante para *E. coli* e coliformes, estas placas foram incubadas a 37±0,5 °C por 24±2 horas, em seguida as amostras positivas, caracterizadas pelo crescimento de colônias roxas, foram submetidas à provas bioquímicas SIM (sulfito, indol e motilidade), citrato e TSI (tríplice sugar and iron). Uma colônia característica de cada placa foi escolhida e transferida com auxílio de alça de platina para tubos contendo meio para as provas bioquímicas, e incubadas a 37±0,5 °C por 24±2 horas. Como controle positivo usou-se a cepa padrão catalogada de *E. coli* (ATCC 25923).

PESQUISA DE *Staphylococcus* sp.

Para o isolamento foi realizado a técnica padrão descrita em Silva *et al.* (2001), no qual foram utilizados 25 g de cada amostra de queijo, e homogeneizados em 225 mL de Solução Salina Estéril (NaCl 0,85% p/v) com 0,1% (p/v) de Peptona (SSP), a fim de obter a diluição inicial (10⁻¹). Posteriormente 1 mL de cada diluição foi transferida para tubos de ensaio contendo 9 mL de Solução Salina Peptonada 0,1%, obtendo-se a diluição 10⁻². Tal procedimento foi repetido por mais três vezes para se obter as diluições 10⁻³, 10⁻⁴, 10⁻⁵.

Após as diluições, 100 µL de cada diluição, foram semeadas, em duplicata, na superfície de placas de Petri contendo Ágar manitol salgado, espalhadas com auxílio de alça de Drigalsky, e em seguida incubadas a 35-37 °C por 48 horas.

Passado o período de incubação, procedeu-se a contagem presuntiva do número de colônias que apresentavam características típicas: colônias circulares, pequenas (máximo 1,5 mm em diâmetro), lisas, convexas, com bordas perfeitas e de coloração esbranquiçada. Selecionaram-se 3 colônias suspeitas de *Staphylococcus*, por placa, estas foram transferidas para tubos contendo 1 mL de Caldo Infusão Cérebro Coração (BHI), e incubados por mais 24 horas a 35-37 °C.

A partir do cultivo em BHI, foram realizadas as provas bioquímicas de coloração de Gram, Coagulase e Catalase, para confirmação do gênero. Foi utilizada cepa padrão de *S. aureus* (ATCC 25922) como controle positivo.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

CARACTERIZAÇÃO DAS FARINHAS

Das 15 amostras analisadas, 11 amostras (73,33%) foram positivas para *E. coli* (Tabela 1). As amostras informais apresentaram percentual de contaminação por

E. coli de 77,77%, ou seja, de 9 amostras analisadas 7 se apresentavam contaminadas. Já dentre as amostras formais 66,66% estavam contaminadas, ou seja, das 6 amostras adquiridas em supermercados, submetidas a controle de inspeção, 4 apresentavam contaminação.

Tabela 1 - Número mais provável de coliformes termotolerantes em queijos tipo minas frescal e ocorrência de *Escherichia coli*

Amostra	Tipo de fabricação	Ocorrência de <i>Escherichia coli</i>	NMP/g a 45° C*
1	Informal	Presente	>1,1 x 10 ³
2	Informal	Presente	>1,1 x 10 ³
3	Informal	Presente	>1,1 x 10 ³
4	Informal	Ausente	>1,1 x 10 ³
5	Informal	Presente	>1,1 x 10 ³
6	Informal	Presente	>1,1 x 10 ³
7	Informal	Ausente	>1,1 x 10 ³
8	Informal	Presente	>1,1 x 10 ³
9	Informal	Presente	>1,1 x 10 ³
10	Formal	Presente	>1,1 x 10 ³
11	Formal	Presente	>1,1 x 10 ³
12	Formal	Ausente	0,036 x 10 ²
13	Formal	Presente	>1,1 x 10 ³
14	Formal	Presente	>1,1 x 10 ³
15	Formal	Ausente	0,036 x 10 ²

NOTA: Limite máximo de 5,0 x 10² NMP/g de queijo (BRASIL, 2001).

Resultados semelhantes foram observadas por Paneto *et al.* (2005), que analisaram 50 amostras de queijo do tipo Minas Frescal, comercializados em supermercados da cidade de Araguaína, Tocantins, os quais indicaram contaminação por *E. coli* em 96 % das amostras analisadas. Estes resultados são reforçados por Passos *et al.* (2009), que encontraram um percentual de contaminação de 60 % em amostras de queijo informais e 56,67 % em amostras formais (de um total de 45 amostras analisadas). Assim como o estudo de Campos *et al.* (2009), que constatou a presença de *E. coli* em 70,8 % das amostras analisadas, e Casaril *et al.* (2017), que ao analisarem dez amostras de queijos produzidos e comercializados na região sudoeste do Paraná, encontraram contaminação por *E. coli* em 40 % das amostras.

Levando em consideração que *E. coli* se trata de uma das principais bactérias indicadores de contaminação fecal, estes dados demonstram a má qualidade higiênica sanitária na manipulação de queijos. A contaminação pela bactéria indica recente contaminação fecal do produto, podendo ser um risco à saúde dos consumidores, devido a patogenicidade de algumas cepas. Sabe-se que a maioria das *E. coli* presentes no trato gastrointestinal é inócua, porém, quando distribuídas em outras partes do corpo, como no trato urinário ou meninges, podem provocar doenças, e causar diarreia, com muco e sangue em alguns casos (HOBBS; ROBERTS, 1993).

Para a avaliação microbiológica dos coliformes termotolerantes foram considerados os padrões microbiológicos determinados para queijos de umidade

elevada, estabelecidos na RDC no 12 de 2001, da Agência Nacional de Vigilância sanitária (ANVISA), a qual preconiza um limite máximo de coliformes a 45 °C de $5,0 \times 10^2$ NMP g⁻¹ de queijo (BRASIL, 2001).

Nesta análise foi possível identificar que 86,66 % das amostras apresentaram contaminação acima do valor estabelecido para coliformes a 45 °C. Analisando-se 15 amostras, apenas 2 amostras foram consideradas próprias para consumo, ambas de produtores formais, adquiridas em supermercados da região.

Estes resultados corroboram com Souza *et al.* (2016), que ao analisarem um total de 50 amostras encontraram uma porcentagem de contaminação por coliformes termotolerantes em 20 amostras (40 %) dos queijos do tipo Minas Frescal comercializados na Zona da Mata Mineira, sendo 15 amostras de origem formal e 5 de origem informal. Estes resultados somam-se aos encontrados por Cararo e Hautrive (2013), que ao realizarem a análise de nove amostras de queijos artesanais, encontraram uma porcentagem de 77,7 % (n=7) de contaminação de coliformes termotolerantes.

Podemos citar ainda Antonello, Kupkovski e Bravo (2012), que ao analisarem 28 amostras de queijos encontraram um percentual de 67,85 % de contagens superiores às estabelecidas pela legislação para coliformes termotolerantes. E Dias *et al.* (2016), que analisaram 5 amostras de queijo Minas Frescal industrializadas e 5 amostras artesanais, e constataram que as cinco amostras industrializadas (50 %), apresentaram contagem acima do limite máximo permitido para coliformes termotolerantes, enquanto que apenas duas amostras artesanais (20 %) estavam em desacordo com os padrões estabelecidos.

Detectar a contaminação por coliformes em alimentos apresenta grande importância para a indicação de contaminação, tanto durante o processo de fabricação, quanto no pós-processamento do produto. Os microrganismos indicadores, quando são detectados em um alimento, podem fornecer informações sobre a ocorrência de contaminação fecal, presença de patógenos, deterioração potencial de um alimento, e indicar práticas de higiene e de sanitização inadequadas durante o processamento, produção ou armazenamento do produto (FRANCO; LANDGRAF, 2008; BRANT; FONSECA; SILVA, 2007).

A presença de coliformes termotolerantes nos alimentos é um indicativo de contato direto e/ou indireto do produto com fezes, uma vez que *E. coli* não faz parte da microbiota normal de produtos frescos, sendo encontrada exclusivamente no intestino do homem e animais de sangue quente. Além de indicar a possível presença de enteropatógenos, várias cepas de *E. coli* são patogênicas ao homem (FRANCO; LANDGRAF, 2008).

Quanto a presença de bactérias do gênero *Staphylococcus* sp., após incubação observou-se que 8 do total de 15 amostras analisadas (53,33 %), apresentaram resultado positivo, 2 das 6 amostras formais/industrializadas avaliadas (33,33 %), e 6 das 9 amostras informais/artesanais (66,66 %).

O gênero *Staphylococcus* é composto de 51 espécies e 28 subespécies, mas apenas 5 delas são coagulase positiva: *S. aureus*; *S. schleiferi* subesp. *coagulans*; *S. intermedius*; *S. hyicus* e *S. delphini* (BANNERMAN, 2003). Três delas (*S. aureus*, *S. intermedius* e *S. hyicus*) foram descritas como produtoras de enterotoxinas e associadas a surtos de intoxicação alimentar. Com relação às outras duas espécies,

não há relato de seu isolamento em alimentos e/ou de seu envolvimento em casos de intoxicações alimentares (KONEMAN; ALLEN; JANDA, 2001).

Carmo *et al.* (2002), relataram a ocorrência de dois surtos de intoxicação estafilocócica causados pelo consumo de queijo Minas e leite, ocorridos em dois Municípios do estado de Minas Gerais. No primeiro surto, o consumo de Queijo Minas foi incriminado e envolveu 50 pessoas, enquanto que no segundo surto, o consumo de leite cru proveniente de animais com mastite causou a intoxicação de 328 pessoas.

A presença de *Staphylococcus*, pode estar relacionada com o processo de manipulação dos queijos, pois os manipuladores representam a principal fonte de transmissão dessa bactéria (BORGES *et al.*, 2008b). Segundo Stamford *et al.* (2006), entre os *Staphylococcus*, a espécie *S. aureus* é a mais prevalente na cadeia do leite in natura, servindo de fonte para a contaminação de seus subprodutos.

De acordo com a Tabela 2, os resultados obtidos mostram que do total de 8 amostras coagulase positiva, 83,33 % (5/6) das amostras informais e 100 % (2/2) das formais, apresentaram-se fora dos padrões legais estabelecidos pela RDC nº 12 da ANVISA, cujo limite para o queijo Minas Frescal sem adição de bactérias lácticas de *Staphylococcus coagulase* positiva é, no máximo, de $5,0 \times 10^2$ UFC.g⁻¹ (BRASIL, 2001). Ou seja, sete amostras estudadas são classificadas como impróprias para consumo humano, dada à constatação de níveis de contaminação superiores aos permitidos pela legislação.

Tabela 2- UFC/g de *Staphylococcus coagulase* positiva em amostras (n=8) de queijo Minas Frescal informais e formais, de acordo com o estabelecido pela legislação brasileira.

UFC. g ⁻¹ de <i>Staphylococcus coagulase</i> positiva	Amostras Informais			Amostras Formais		
	n	%	Status	n	%	Status
< $1,0 \cdot 10^2$	-	-	-	-	-	-
$1,1 \cdot 10^2 - 5,0 \cdot 10^2$	1	16,67	C	-	-	-
$5,1 \cdot 10^2 - 5,0 \cdot 10^3$	2	33,33	NC	-	-	-
> $5,0 \cdot 10^3$	3	50	NC	2	100	NC

NOTA: Resultados expressos em número (n) e porcentagem (%) de amostras. C: Conforme; NC: Não Conforme.

O consumo de alimentos contaminados com enterotoxinas produzidas por *S. aureus*, dependendo da suscetibilidade individual e da dose tóxica ingerida, proporciona o estabelecimento do quadro de intoxicação alimentar estafilocócica, sendo que a contagem de *S. aureus* deve ser de 10^5 a 10^6 UFC.g⁻¹ de alimento para produzir enterotoxina em níveis capazes de provocar intoxicação alimentar (FRANCO; LANDGRAF, 2008; PELISSER *et al.*, 2009).

Os resultados deste estudo vão de encontro a trabalhos anteriores realizados com queijo Minas Frescal, onde a grande maioria observou contaminações estafilocócicas. Loguercio e Aleixo (2001), relataram que 96,67 % das amostras artesanais avaliadas (29 de um total de 30 amostras) em Cuiabá – MT apresentavam contagens superiores ao padrão legal aceitável para *S. aureus*. Em Uberlândia – MG, Komatsu *et al.* (2010), observaram que 88 % de 50 amostras de

queijo Minas frescal artesanais avaliadas estavam fora do padrão estabelecido pelo Ministério da Saúde para *Staphylococcus coagulase* positiva.

Da mesma forma Brant, Fonseca e Silva (2007), observando a qualidade microbiológica de queijos artesanais da região de Serro – MG, 33 amostras (82,5 %) apresentaram contagens de *Staphylococcus coagulase* positiva acima dos padrões legais, estando impróprias ao consumo humano. Dias *et al.* (2016), ao avaliarem queijos comercializados na região sul de Goiás, detectou que 100 % das amostras tanto as artesanais quando as industriais, se apresentavam acima do limite de no máximo de $5,0 \times 10^2$ UFC.g⁻¹, estabelecido pela ANVISA conforme Resolução - RDC n° 12, de janeiro de 2001.

Senger e Bizani (2011), relataram que dentre 30 amostras de produção artesanal na cidade de Canoas – RS, 40 % das amostras se apresentaram fora do padrão estabelecido pela legislação, enquanto que de 30 amostras industriais 23,3 % estavam a cima dos padrões estabelecidos.

Melhorias sanitárias na fabricação de produtos de origem animal têm mostrado resultados satisfatórios. Segundo Durek (2005), resultados de grande relevância e influência na qualidade do produto final, foram obtidos após a adoção das BPF em 189 estabelecimentos produtores de derivados lácteos registrados no Serviço de Inspeção Federal (SIF), nas regiões norte, sul, sudeste e centro-oeste do Brasil.

Grandi (2007), realizou um estudo na cidade de Uberlândia – MG, com 20 amostras de queijo Minas Frescal artesanais, produzidos em estabelecimentos sob inspeção federal, e não verificou a presença de *Staphylococcus coagulase* positiva nestes produtos. Salotti *et al.* (2006), em Jaboticabal – SP, encontrou 30 % das amostras positivas e Peresi *et al.* (2001), em São José do Rio Preto – SP, encontrou *S. aureus* em 43 % das amostras estudadas. Ambos os estudos também analisaram queijos artesanais inspecionados e encontraram resultados de contaminação inferiores aos estudos anteriormente citados. Fato que se deve provavelmente aos produtos inspecionados possuírem um maior controle higiênico-sanitário durante a produção, reduzindo assim os índices de contaminação das amostras analisadas.

A incidência de surtos de doenças alimentares requer investigações cuidadosas quanto a história dos alimentos veiculadores de doenças, condições ambientais das áreas de produção e de preparo, identificação do agente etiológico e condições de saúde dos manipuladores de alimentos (WELKER *et al.*, 2010).

A prevenção dessas doenças depende da execução adequada de procedimentos durante as etapas de produção até a venda do produto final, levando em consideração fatores primordiais para a garantia de um alimento seguro para o consumo, como a higiene e o binômio tempo-temperatura. O conhecimento nas áreas de microbiologia, genética microbiana e higiene dos alimentos é fundamental para detecção das causas e origens das contaminações, assim como para a redução de seus riscos (WHO, 2013).

A qualidade inicial do leite é a primeira condição para obter um produto final bom. Quando o número de bactérias patogênicas iniciais do leite é elevado, os processos de beneficiamento e industrialização, em geral, não são eficientes para

sua destruição. Além disso, durante o processo produtivo, podem ocorrer contaminações por diversas formas e microrganismos, portanto, práticas de higiene devem ser observadas para prevenir a possível contaminação do produto (SENGER; BIZANI, 2011).

Geralmente, o leite utilizado na fabricação de queijos artesanais não é pasteurizado, contudo a pasteurização não garante a produção de queijos livres de microrganismos, uma vez que pode ocorrer recontaminação devido à manipulação excessiva quando realizada por pessoas sem nenhum conhecimento e/ou cuidado de higiene (PERRY, 2004).

A ocorrência de amostras positivas neste estudo, permite supor que o tratamento térmico do leite esteja sendo ineficiente, ou que estejam ocorrendo contaminação após este tratamento, devido a manipulação ou contato com superfícies não sanitizadas, ou, o que é mais comum em produções artesanais, esteja sendo utilizado o leite cru, não pasteurizado, na fabricação do queijo. Este fato está totalmente em desacordo com as recomendações do Ministério da Saúde e da Agricultura. Portanto, maior atenção deve ser tomada pelas autoridades sanitárias, uma vez que tais produtos colocam em risco a saúde do consumidor, além de comprometerem a qualidade e prazo de validade dos produtos (LOGUERCIO; ALEIXO, 2001).

Para diminuir os riscos de contaminação na indústria, é recomendável que o leite passe por um processo de controle de pasteurização, e também, seja monitorado por um rígido controle de qualidade, do início ao fim da produção, até chegar aos locais de comercialização. A produção artesanal também exige atenção fiscalizadora, onde o mais importante é, antes de tudo, a orientação e o treinamento dos fabricantes, quanto aos métodos higiênico-sanitários a serem adotados no estabelecimento (DIAS *et al.*, 2016).

Cabe às secretarias de saúde dos Municípios a função de fiscalização. Esse setor tem competência de conceder e cancelar o Certificado de Cumprimento de Boas Práticas de Fabricação, interditar, como medida de vigilância sanitária, os locais de fabricação, controle, armazenamento, distribuição e venda de produtos e a prestação de serviços relativos à saúde, no caso de violação da legislação pertinente ou de risco iminente à saúde.

Portanto, faz-se necessário maior atenção das autoridades em vigilância sanitária, quanto aos estabelecimentos de produção, sejam eles industrial/formal ou artesanal/informal, em relação à autorização de funcionamento, à qualidade da matéria-prima, à produção, à conservação e comercialização, evitando-se assim o comprometimento da saúde do consumidor (SENGER; BIZANI, 2011)..

CONCLUSÕES

Após analisar os resultados, foi possível concluir que das 15 amostras de queijo Minas Frescal analisadas, 11 amostras foram positivas para *E. coli*, equivalente a 73,33 % do total de amostras analisadas. 77,77 % das amostras adquiridas de produtores informais apresentaram contaminação, enquanto que 66,66 % das amostras formais obtidas em supermercados da região também estavam contaminadas. Na análise de número mais provável (NMP.g-1), foi

observado que 86,66 % das amostras apresentaram níveis superiores ao valor estabelecido pela RDC nº 12 da ANVISA, sendo que somente duas amostras, ambas obtidas de produtores formais, foram consideradas próprias para consumo.

A presença de bactérias coagulase positivas, pertencentes ao gênero *Staphylococcus*, foi observada em oito amostras (53,33 %) do total de quinze amostras analisadas. Das 8 amostras coagulase positivas, 2 industrializadas e 5 artesanais apresentaram-se acima dos padrões legais estabelecidos.

Estes resultados evidenciam possíveis falhas no controle de qualidade, falta de condições higiênico-sanitárias durante as etapas de produção, e/ou após o processamento, por meio do manuseio inadequado, tratamento térmico ineficiente, refrigeração insuficiente, ou uso de leite de má qualidade.

Occurrence of *Escherichia coli* and *Staphylococcus* sp. in Minas Frescal-type cheeses marketed in open markets and supermarkets in the West of Paraná

ABSTRACT

Food intoxications occurs due to the multiplication of pathogenic microorganisms in different types of foods, with cheese being one of the main factors related to this disease. The industry adopts Good Manufacturing Practices (GMP), which consist of a quality control system, which aims to ensure food safety. When the production of the cheese takes place in an artisanal way, the GMP and the hygienic sanitary controls are not always observed, putting the health of the consumer at risk. The objective of this study was to verify the presence of *Escherichia coli* and bacteria of the genus *Staphylococcus* in Minas Frescal type cheeses, marketed in free markets and supermarkets in the West of Paraná. Fifteen cheese samples were analyzed, being six formal/industrialized samples, and nine from informal/artisanal producers. It was possible to observe that 86.66% of the samples presented above the established value for thermotolerant coliforms. A total of 73.33% of the samples were contaminated with *E. coli* (seven samples from informal producers and four samples from formal producers). Two formal samples and five informal samples presented above the *Staphylococcus* contamination limits established by RDC nº 12 of ANVISA, classified as unfit for human consumption. These results show possible quality control failures, lack of hygienic-sanitary conditions during the production stages, and/or after processing, through inadequate handling, inefficient heat treatment, insufficient refrigeration, or the use of poor quality milk.

KEYWORDS: Enterotoxins; staphylococcal intoxication; thermotolerant coliforms; handmade cheese.

REFERÊNCIAS

ALVES, A. R. F. **Doenças alimentares de origem bacteriana**. Dissertação Mestrado em Ciências Farmacêuticas. Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade Fernando Pessoa, Porto, 2012. Disponível em: <http://bdigital.ufp.pt/bitstream/10284/3756/3/PPG_AnaAlves.pdf> Acesso em: 11 de setembro de 2017.

ANTONELLO, L.; KUPKOVSKI, A.; BRAVO, C. C. Qualidade microbiológica de queijos coloniais comercializados em Francisco Beltrão, Paraná. **Revista Thema**, v. 9, n. 1, 2012.

BANNERMAN, T. L. *Staphylococcus, Micrococcus, and other catalase-positive cocci that grow aerobically*. **Manual of clinical microbiology**, v. 8, p. 384-404, 2003.

BORGES, M. F.; NASSU, R. T.; PEREIRA, J. L.; ANDRADE, A. P. C.; KUAYE, A. Y. Perfil da contaminação por estafilococos e suas enterotoxinas e monitorização das condições de higiene em uma linha de produção de queijo de coalho. **Ciência Rural**, v. 38, n. 5, p. 1434-1438, 2008a.

BORGES, M. F.; ARCURI, E. F.; PEREIRA, J. L.; FEITOSA, T.; KUAYE, A. Y. *Staphylococcus* enterotoxigênicos em leite e produtos lácteos, suas enterotoxinas e genes associados: revisão. **Boletim do Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos**, v. 26, n. 1, p. 70-86, 2008b.

BRANT, L. M. F.; FONSECA, L. M.; SILVA, M. C. C. Avaliação da qualidade microbiológica do queijo-de-minas artesanal do Serro-MG. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 59, n. 6, p. 1570-1574, 2007.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Resolução nº 12, de 02 de janeiro de 2001**. Regulamento Técnico sobre Padrões Microbiológicos para Alimentos. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília, DF, jan. 2001.

BRASIL. **Decreto nº 9.013, de 29 de março de 2017**. Regulamenta a Lei nº 1.283, de 18 de dezembro de 1950, e a Lei nº 7.889, de 23 de novembro de 1989, que dispõem sobre a inspeção industrial e sanitária de produtos de origem animal. Diário Oficial, Brasília, DF, 29 mar. 2017. Seção 1, p. 3.

CAMPOS, M. R. H., ANDRÉ, M. C. D. P. B., BORGES, L. J., KIPNIS, A., PIMENTA, F. C., SERAFINI, A. B. Genetic heterogeneity of *Escherichia coli* strains isolated from raw Milk, Minas Frescal cheese, and food handlers. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 61, n. 5, p. 1203-1209, 2009.

CARARO, P.; HAUTRIVE, T. P. **Condições higiênicas-sanitárias de queijos artesanais comercializados em feiras coloniais**. 2013. Disponível em: <<http://www.uniedu.sed.sc.gov.br/wp-content/uploads/2013/10/Priscila-Cararo.pdf>> Acesso em: 12 de setembro de 2017.

CARMO, L. S.; DIAS, R. S.; LINARDI, V. R., SENA, M. J.; SANTOS, D. A. dos; FARIA, M. E. DE; HENEINE, L. G. 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.

CASARIL, K. B. P. B.; BENTO, C. B. P.; HENNING, K.; PEREIRA, M.; DIAS, V. A. Qualidade microbiológica de salames e queijos coloniais produzidos e comercializados na região sudoeste do Paraná. **Revista Brasileira de Agropecuária Sustentável (RBAS)**, v.7, n. 2, p. 75-85, 2017.

CASSETTARI, V. C.; STRABELLI, T.; MEDEIROS, E. A. S. *Staphylococcus aureus* bacteremia: what is the impact of oxacillin resistance on mortality? **Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 9, n. 1, p. 70-6, 2005.

DIAS, B. F.; FERREIRA, S. M.; CARVALHO, V. S.; SOARES, D. S. B. Qualidade microbiológica e físico-química de queijo minas frescal artesanal e industrial. **Revista de Agricultura Neotropical**, v. 3, n. 3, p. 57-64, 2016.

DUREK, C. M. **Verificação das boas práticas de fabricação em indústrias de leite e derivados, registrados no Serviço de Inspeção Federal – SIF**. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2005.

FERREIRA, G. B.; OLIVEIRA, A. C. S.; MARSON, J. M.; TERRA, A. P. S. Pesquisa de *Staphylococcus aureus* em queijos tipo “minas frescal” comercializados na região do Triângulo Mineiro. **Revista Baiana de Saúde Pública**, v. 34, n. 3, p. 575- 589, 2010.

FRANCO, B. D. G. M.; LANDGRAF, M. **Microbiologia dos Alimentos**. 2 ed. São Paulo: Atheneu, 2008. 184p.

GANDRA, E. A. **Identificação de *Staphylococcus aureus*, *S. hyicus* e *S. intermedius* através de testes bioquímicos e da amplificação por PCR de sequências dos genes *coa* e *nuc***. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia Agroindustrial) – Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2003.

GASPAROTTO, P. H. G.; ROCHA, C. S.; GRECELLÉ, C. B. Z. **Quantificação de coliformes totais e fecais pela técnica do NMP em amostras de água do um**

Município de Ji-Paraná. 2008. Disponível em:
<www.revista.ulbrajp.edu.br/seer/inicia/ojs/include/getdoc.php?id=1279&article=440&mode=pdf>. Acesso em: 23 de março de 2016.

GRANDI, A. Z. Qualidade microbiológica do queijo minas frescal comercializado na cidade de Uberlândia – MG. **Horizonte Científico**, v. 1, n. 1, 2007.

HOBBS, B. C.; ROBERTS, D. **Toxinfecções e controle higiênico sanitário de alimentos.** São Paulo: Varela, 1993.

JAY, JM. **Microbiologia de alimentos.** 6 ed. São Paulo: Artmed, 2005.

KOMATSU, R. S.; RODRIGUES, M. A. M.; LORENO, W. B. N.; SANTOS, K. A. Ocorrência de *Staphylococcus* coagulase positiva em queijo minas frescal produzido em Uberlândia-MG. **Bioscience Journal**, v. 26, n. 2, 2010.

KONEMAN, E. W.; ALLEN, S. D.; JANDA, W. M. **Diagnóstico microbiológico: Texto e Atlas Colorido.** 5 ed. Rio de Janeiro: Medsi, 2001. 1456p.

LAMAITA, H. C.; CERQUEIRA, M. M. O. P.; CARMO, L. S.; SANTOS, D. A.; PENNA, C. F. A. M.; SOUZA, M. R. 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.

LOGUERCIO, A, P.; ALEIXO, J. A. G. Microbiologia de queijo tipo minas frescal produzido artesanalmente. **Ciência Rural**, v. 31, n. 6, 2001.

MARTINS, E. Patrimônio de Minas. **Economia Jornal Estado de Minas**, n. 44, p. 14-17, 2001.

PANETO, B. R.; VIEIRA, S. D.; ITURRINO, R. P. S.; SNATO, E.; MARIN, J. M. Ocorrência de *Escherichia coli* toxigênica em queijo tipo minas frescal comercializado na cidade de Araguaína- TO. In: **Congresso brasileiro de microbiologia.** Santos. Anais, v. 23, 2005.

PASSOS, A. D.; FERREIRA, G. K. L.; JULIANI, G. L.; SANTANA, E. H. W.; ARAGON-ALEGRO, L. C. Avaliação microbiológica de queijos minas frescal comercializados nas cidades de Arapongas e Londrina – PR. **Rev Instit Laticínios Cândido Tostes**, v. 64, n. 369, p. 48-54, 2009.

PELISSER, M. R.; KLEIN, C. S.; ASCOLI, K. R.; ZOTTI, T. R.; ARISI, A. C. M. Occurrence of *Staphylococcus aureus* and multiplex PCR detection of classic enterotoxin genes in cheese and meat products. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 40, p. 145–148, 2009.

PERESI, J. T. M.; GRACIANO, R. A. S.; ALMEIDA, I. A. Z. C.; LIMA, S. I.; RIBEIRO, A. K.; CARVALHO, I. S.; LIMA, M. Queijo Minas tipo frescal artesanal e industrial, qualidade microscópica, microbiológica e teste de sensibilidade aos agentes antimicrobianos. **Revista Higiene Alimentar**, v. 15, n. 83, p. 63-70, 2001.

PERRY, K.S.P. Queijos: aspectos químicos, bioquímicos e microbiológicos. **Química Nova**, v. 27, p. 293-300, 2004.

SANTANA, R. F.; SANTOS, D. M.; MARTINEZ, A. C. C.; LIMA, A. S. Qualidade microbiológica de queijo-coalho comercializado em Aracaju, SE. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 60, n. 6, p. 1517-1522, 2008.

SALOTTI, B. M.; CARVALHO, A. C. F. B.; AMARAL, L. A., VIDAL-MARTINS, A. M. C., CORTEZ, A. L. Qualidade microbiológica do queijo minas frescal comercializado no município de Jaboticabal, SP, Brasil. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 73, n. 2, p. 171-175, 2006.

SALVADOR, M.; CAMASSOA, M.; MOSCHEN, E. S.; ZANROSSO, A. V. Avaliação microbiológica do queijo de prato e parmesão ralado. **Boletim do Centro de Pesquisa e Processamento de Alimentos**, v. 19, n. 1, p. 65-74, 2001.

SCHERRER D.; CORTI S.; MUEHLHER J.E.; ZWEIFEL C. STEPHAN R. Phenotypic and genotypic characteristics of *Staphylococcus aureus* isolates from raw bulk-tank samples of goat and sheep. **Veterinary Microbiology**, v. 101, n. 2, p. 101- 107, 2004.

SENGER, A. E. V.; BIZANI, D. Pesquisa de *Staphylococcus aureus* em queijo minas frescal, produzido de forma artesanal e industrial, comercializado na cidade de Canoas/RS, Brasil. **Revista de Ciências Ambientais**, v. 5, n. 2, p. 25-42, 2011.

SILVA, N., JUNQUEIRA, V. C. A., SILVEIRA, N. F. A. **Manual de métodos de análise microbiológica em alimentos**, 2 ed. São Paulo: Varela, 2001.

SOUZA, I. A.; GIOVANNETTI, A. C. S.; SANTOS, L. G. F.; GRANDA, S. O. S.; RAMOS, A. L. S.; MARTINS, M.L.; BENEVENUTO, W. C. A. N. Ocorrência de *Escherichia coli* em queijo do tipo minas frescal comercializado na Zona da Mata mineira. In: **XXV Congresso Brasileiro de Ciência e Tecnologia de alimentos**, 2016.

STAMFORD, T. L. M.; SILVA, C. G. M. D.; MOTA, R. A.; CUNHA NETO, A. D. Enterotoxigenicidade de *Staphylococcus* spp. isolados de leite in natura. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 26, n. 1, p. 41-45, 2006.

TRABULSI, L. R.; ALTERTHUM, F. **Microbiologia**. 5ª ed. São Paulo: Atheneu, 2008.

WELKER, C. A. D.; BOTH, J. M. C.; LONGARAY, S. M.; HAAS, S.; SOEIRO, M. L. T.; RAMOS, R. C. Análise microbiológica dos alimentos envolvidos em surtos de doenças transmitidas por alimentos (DTA) ocorridos no estado do Rio Grande do Sul, Brasil. **Revista Brasileira de Biociências**, v. 8, n. 1, p. 44-48, 2010.

WHO - World Health Organization. **Prevention of foodborne disease: Five keys to safer food**. 2013. Disponível em: <<http://www.who.int/foodsafety/consumer/5keys/en/>>. Acesso em: 20 jul 2017.

Recebido: 06 nov. 2017.

Aprovado: 18 mar. 2019.

DOI: 10.3895/rebrapa.v9n4.7293

Como citar:

SCHER, D. D. et al. Ocorrência de *Escherichia coli* e *Staphylococcus* sp. em queijos do tipo minas frescal comercializados em feiras livres e supermercados no Oeste do Paraná. **Brazilian Journal of Food Research**, Campo Mourão, v. 9, n. 4, p. 105-120, out./dez. 2018. Disponível em: <https://periodicos.utfpr.edu.br/rebrapa>

Correspondência:

Jaqueline Hoscheid

Escola de Ciências da Vida, Curso de Farmácia, Pontifícia Universidade Católica do Paraná, Campus Toledo, Toledo, Paraná, Brasil.

Direito autoral: Este artigo está licenciado sob os termos da Licença Creative Commons-Atribuição 4.0 Internacional.

