



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIA DE ALIMENTOS



**AVALIAÇÃO DA CONTAMINAÇÃO POR MICRORGANISMOS
ESPORULADOS E INDICADORES EM REQUEIJÃO CREMOSO**

Alessandra Frias Reyes

Bióloga

Orientadora: Pilar Rodriguez de Massaguer, Ph.D.

Dissertação apresentada à Faculdade de Engenharia de Alimentos
da Universidade Estadual de Campinas para obtenção
do grau de Mestre em Ciência de Alimentos

Campinas – SP

2008

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA FEA – UNICAMP

R33a Reyes, Alessandra Frias
Avaliação da contaminação por microrganismos esporulados e indicadores em requeijão cremoso / Alessandra Frias Reyes. --Campinas, SP: [s.n.], 2008.

Orientador: Pilar Rodriguez de Massaguer
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia de Alimentos

1. Requeijão cremoso. 2. Vida de prateleira. 3. Patogênicos. 4. Levantamento microbiológico. I. Massaguer, Pilar Rodriguez de. II. Universidade Estadual de Campinas.Faculdade de Engenharia de Alimentos. III. Título.

(fea/cars)

Titulo em inglês: Microbiological evaluation of indicators and sporeforms in requeijão cream cheese

Palavras-chave em inglês (Keywords): Cream cheese, Shelf-life, Pathogens, Microbiological survey

Titulação: Mestre em Ciência de Alimentos

Banca examinadora: Pilar Rodriguez de Massaguer

Ariene Gimenes Fernandes Van Dender

Cristiana de Paula Pacheco Sanchez

José Luiz Pereira

Data da defesa: 27/02/2008

Programa de Pós Graduação: Programa em Ciência de Alimentos

Banca Examinadora

Prof^a. Pilar Rodríguez de Massaguer, PhD

Orientadora

Dra. Ariene Gimenes Fernandes Van Dender

Membro

Dra. Cristiana de Paula Pacheco Sanchez

Membro

Prof^o. Dr. José Luiz Pereira

Membro

AGRADECIMENTOS

- ❖ À Professora Pilar Rodriguez de Massaguer pelos ensinamentos e orientação;
- ❖ À CNPq pela bolsa concedida;
- ❖ Aos membros da banca examinadora pela atenção dispensada;
- ❖ A meus pais, por todo o carinho e conforto;
- ❖ À Marilia Victal pela colaboração e incentivo;
- ❖ À todos os colegas do Laboratório de Termobacteriologia pela colaboração na pesquisa;
- ❖ Aos Funcionários do Departamento de Ciências de Alimentos;
- ❖ À Eliane e Salatir, pela amizade;
- ❖ À Cristiana, Ale mãe e Veronica, pela ajuda e ensinamentos.;
- ❖ Ao Fernando, pela compreensão e paciência.

“Não tenho um caminho novo,
o que tenho de novo, é o jeito de caminhar.”

Thiago de Mello

Aos meus Pais,
pelo amor eterno,
dedico.

ÍNDICE

ÍNDICE DE TABELAS	XII
ÍNDICE DE FIGURAS	XIV
RESUMO	XV
ABSTRACT	XVIII
1. Introdução	1
2. Objetivos	4
3. Revisão Bibliográfica	5
3.1 O Requeijão	5
3.1.1. Mercado Nacional de Requeijão	8
3.1.2. Requeijão x Especialidade Láctea	10
3.1.3. Classificação dos tipos de requeijão	12
3.2. Características dos principais microrganismos deteriorantes de Queijos Fundidos	13
3.2.1. Características do gênero <i>Bacillus</i>	14
3.2.1.1. Reclassificação do gênero <i>Bacillus</i>	14
3.2.1.2. Gênero <i>Bacillus</i>	16
3.2.1.3. Características da espécie <i>B. cereus</i>	17
3.2.1.4. Características da espécie <i>B. coagulans</i>	19
3.2.1.5. Características da espécie <i>B. sporothermodurans</i>	20
3.2.1.6. Características da espécie <i>G. stearothermophilus</i>	20
3.2.1.7. Características da espécie <i>B. subtilis</i>	22
3.2.2. Características do gênero <i>Clostridium</i>	23
3.2.2.1. Características da espécie <i>C. butyricum</i>	25
3.2.2.2. Características da espécie <i>C. saccharobutyricum</i>	26
3.2.2.3. Características da espécie <i>C. tyrobutiricum</i>	26
3.2.2.4. Características da espécie <i>C. sporogenes</i>	26
3.2.2.5. Características da espécie <i>C. perfringens</i>	27
3.2.2.6. Características da espécie <i>C. thermosaccharolyticum</i>	28
3.2.3. Microrganismos Gram negativos psicrótróficas	29
3.2.4. Bactérias Lácticas	30
3.2.5. Importância e Distribuição de <i>Listéria monocytogenes</i> nos alimentos e	

especificamente em queijos _____	31
3.3. Incidência de microrganismos esporulados em alimentos processados __	35
3.4. Mecanismo de esporulação _____	40
3.4.1. Fatores que afetam o processo de esporulação _____	42
3.4.2. Processo de germinação _____	44
3.4.3. Resistência Térmica dos Principais Contaminantes _____	45
3.4.4. Determinação do valor “ F_T ” requerido para o processo térmico _____	45
3.5. Contaminação Microbiológica das Matérias-Primas _____	47
3.5.1. Leite _____	47
3.5.2. Leite cru _____	47
3.5.3. Leite Pasteurizado _____	49
3.5.4. Creme _____	50
3.5.5. Manteiga _____	51
3.5.6. Queijos _____	51
3.5.7. Leite em Pó e Caseinatos _____	52
3.5.8. Especiarias e Condimentos _____	53
3.6. Limites de contaminação do requeijão _____	53
3.6.1. Critérios Macroscópicos e Microscópicos _____	53
3.6.2. Critérios Microbiológicos _____	53
3.7. Medidas Corretivas e Medidas Preventivas _____	55
3.8. Processo de fabricação de Requeijão _____	58
4. Metodologia _____	65
4.1. O Produto _____	65
4.2. Análises dos ingredientes, Produto de Linha e do Produto Final _____	67
4.2.1. Detecção de <i>Listeria monocytogenes</i> _____	67
4.2.1.1. Princípio do Kit MINI VIDAS LMOII	67
4.2.2. Quantificação de Coliformes Totais e Fecais _____	69
4.2.3. Quantificação de <i>Staphylococcus aureus</i> e verificação da presença da enzima coagulase e Dnase _____	70
4.2.3.1. Verificação da presença da enzima coagulase	71
4.2.3.2. Verificação da presença da enzima Dnase	71
4.2.4. Quantificação de <i>Clostridium perfringens</i> _____	72
4.2.4.1. Teste de confirmação de <i>C. perfringens</i>	73
4.2.5. Quantificação de Mesófilos Aeróbios Esporulados _____	73

4.2.6. Quantificação de Termófilos Aeróbios Esporulados _____	74
4.2.7. Quantificação de Mesófilos Anaeróbios Esporulados _____	75
4.2.8. Quantificação de Termófilos Anaeróbios Esporulados _____	76
4.3. Acompanhamento da vida de prateleira do requeijão _____	77
4.4. Microrganismos esporulados isolados durante a vida de prateleira. _____	78
4.5. Caracterização em nível de gênero _____	79
4.6. Manutenção dos Isolados _____	79
4.7. Esporulação dos isolados provenientes do acompanhamento de vida de prateleira lote 2 _____	80
4.7.1. Metodologia para produção e coleta dos esporos do gênero <i>Bacillus</i> _____	80
4.7.2. Metodologia para produção e coleta dos esporos de anaeróbios estritos e facultativos. _____	82
4.7.2.1. Teste para diferenciação da capacidade proteolítica e não proteolítica dos isolados anaeróbios	82
4.7.2.2. Metodologia utilizada para esporulação das espécies não proteolíticas	82
4.7.2.3. Metodologia utilizada para esporulação das espécies proteolíticas	83
4.8. Padronização e contagem das suspensões de esporos produzidas _____	85
4.8.1. Contagem das suspensões <i>Bacillus</i> aeróbios estritos _____	85
4.8.2. Contagem das suspensões de <i>Bacillus</i> anaeróbios facultativos e <i>Clostridium</i> _____	86
4.8.3. Determinação do tempo de atraso térmico _____	86
4.9. Choques térmicos progressivos no produto _____	87
4.9.1. Choques progressivos aplicados aos microrganismos aeróbios _____	87
4.9.2. Choques progressivos aplicados aos microrganismos anaeróbios estritos e anaeróbios facultativos _____	88
4.10 Caracterização dos isolados sobreviventes ao choque térmico de 140°C/1' _____	89
4.10.1 Interpretação dos resultados e microscópica dos isolados sobreviventes no meio PE-2: _____	89
4.11 Análise estatística dos resultados _____	92
5. Resultados e Discussão _____	93
5.1. Resultado da detecção de <i>Listeria monocytogenes</i> _____	93

5.2. Quantificação de <i>Staphylococcus aureus</i> _____	95
5.3. Quantificação de Coliformes Totais _____	96
5.4. Quantificação de <i>C. perfringens</i> _____	98
5.5. Quantificação de Microrganismos Mesófilos aeróbios esporulados _____	99
5.6. Quantificação de Microrganismos Termófilos Aeróbios Totais Esporulados 103	
5.7. Quantificação de Microrganismos Termofílicos Aeróbios Esporulados ____	107
5.8. Quantificação de Microrganismos Termófilos Esporulados Acidúricos causadores de “Flat Sour” _____	109
5.9. Quantificação de Microrganismos Mesófilos anaeróbios esporulados. ____	112
5.10. Quantificação de Termófilos anaeróbios esporulados _____	115
5.11. Número de microrganismos isolados referentes ao Lote 1 _____	118
5.12. Número microrganismos isolados referentes ao Lote 2 _____	119
5.13. Acompanhamento da vida de prateleira do Requeijão Cremoso _____	120
5.14. Resultado da detecção de <i>Listeria monocytogenes</i> , contagem de <i>Staphylococcus aureus</i> , Coliformes Totais e de <i>Clostridium perfringens</i> _____	122
5.15. Quantificação de Mesófilos aeróbios esporulados durante a vida de prateleira do produto. _____	122
5.16. Quantificação de termófilos aeróbios esporulados durante a vida de prateleira do produto _____	125
5.17. Quantificação de mesófilos anaeróbios esporulados durante a vida de prateleira do produto _____	127
5.18. Quantificação de termófilos anaeróbios esporulados durante a vida de prateleira do produto _____	129
5.19. Número de microrganismos isolados durante a vida de prateleira do Requeijão Cremoso _____	132
5.20. Resultado da contagem das suspensões de esporos _____	133
5.21. Resultado dos choques progressivos aplicados nos microrganismos aeróbios _____	137
5.22. Resultado dos choques progressivos nos microrganismos anaeróbios	

estritos e facultivos	138
5.23. Caracterização dos isolados sobreviventes ao choque térmico 140º/1'	143
6. Conclusão	146
7. Bibliografia	149
8. APÊNDICE	163

ÍNDICE DE TABELAS

<i>Tabela 3.1: Valores da resistência térmica de alguns microrganismos.....</i>	<i>46</i>
<i>Tabela 3.2: Valores da resistência térmica de espécies de Clostridium em leite ou em tampão fosfato. Não foi indicado o valor z.....</i>	<i>47</i>
<i>Tabela 3.3. Limites microbiológicos para contaminação de requeijão.....</i>	<i>54</i>
<i>Tabela 4.1 Caracterização das amostras de requeijão do lote 1.....</i>	<i>66</i>
<i>Tabela 4.2 Caracterização das amostras de requeijão do lote 2.....</i>	<i>66</i>
<i>Tabela 4.3 Limiar e interpretação dos resultados.....</i>	<i>69</i>
<i>Tabela 5.1. Resultado do teste de detecção de Listeria monocytogenes expressos em RFV* em 25 g de produto em linha de produção de requeijão.....</i>	<i>94</i>
<i>Tabela 5.2. Log₁₀ de UFC de S. aureus /g em linha de produção de requeijão.....</i>	<i>95</i>
<i>Tabela 5.3 Resultado da contagem NMP série de 5 tubos de Coliformes Totais em linha de produção de requeijão.....</i>	<i>97</i>
<i>Tabela 5.4. Resultado, em Log₁₀, da contagem de C. perfringens em linha de produção de requeijão. .</i>	<i>98</i>
<i>Tabela 5.5. Log₁₀ da contagem de esporos mesófilos aeróbios por grama em linha de produção de requeijão.....</i>	<i>100</i>
<i>Tabela 5.6. Log₁₀ da contagem total de esporos Termófilos Aeróbios por 10 g do produto em linha de produção de requeijão.....</i>	<i>104</i>
<i>Tabela 5.7. Resultados da contagem em Log₁₀ de esporos termofílicos causadores de deterioração Flat Sour por 10 g em linha de produção de requeijão.....</i>	<i>107</i>
<i>Tabela 5.8. Resultados da contagem em Log₁₀ de esporulados acidúricos por 10 g causadores de “Flat Sour” em linha de produção de requeijão.....</i>	<i>110</i>
<i>Tabela 5.9 Resultado de Mesófilos Anaeróbios Esporulados expressos em % de tubos positivos de 6 inoculados em linha de produção de requeijão.....</i>	<i>113</i>
<i>Tabela 5.10 Resultado de termófilos anaeróbios esporulados expressos em % de tubos positivos de 6 inoculados em linha de produção de requeijão.....</i>	<i>116</i>
<i>Tabela 5.11. Número de isolados esporulados referentes ao Lote 1.....</i>	<i>119</i>
<i>Tabela 5.12 Número de isolados esporulados referentes ao Lote 2.....</i>	<i>120</i>
<i>Tabela 5.13: Variação do pH durante a vida de prateleira de requeijão.....</i>	<i>121</i>
<i>Tabela 5.14: Resultado da contagem em Log₁₀ de Mesófilos Aeróbios Esporulados/g durante a vida de prateleira do requeijão.....</i>	<i>123</i>
<i>Tabela 5.15: Resultados da contagem em Log₁₀ de Termófilos Aeróbios Esporulados/10g durante a vida de prateleira do requeijão.....</i>	<i>125</i>

<i>Tabela 5.16: Resultado em % do número de tubos positivos / 6 tubos inoculados para Mesófilos Anaeróbios Esporulados durante a vida de prateleira do requeijão.....</i>	<i>127</i>
<i>Tabela 5.17: Resultado em % de tubos positivos da análise de Termófilos Anaeróbios Esporulados durante a vida de prateleira do requeijão.....</i>	<i>130</i>
<i>Tabela 5.18 Número de isolados esporulados referentes ao acompanhamento da vida de prateleira do requeijão.....</i>	<i>133</i>
<i>Tabela 5.19. Resultados das contagens das suspensões de esporos aeróbios dos isolados do 1º e 22º dia de vida de prateleira.....</i>	<i>134</i>
<i>Tabela 5.20. Resultados das contagens das suspensões de esporos anaeróbios facultativos e estritos dos isolados das suspensões do 1 e 22º dia de vida de prateleira.....</i>	<i>135</i>
<i>Tabela 5.21 Caracterização dos isolados anaeróbios facultativos e anaeróbios estritos provenientes do dia 1 e 22º dia da vida de prateleira.</i>	<i>136</i>
<i>Tabela 5.22 Choques progressivos nas suspensões de esporos de aeróbios.....</i>	<i>137</i>
<i>Tabela 5.23 Resultado dos choques progressivos nos microrganismos mesófilos anaeróbios estritos e facultativos.....</i>	<i>140</i>
<i>Tabela 5.24 Resultado do choques progressivos nos microrganismos termófilos anaeróbios estritos e facultativos.....</i>	<i>141</i>
<i>Tabela 5.25 Resultados dos isolados sobreviventes aos choques progressivos nos microrganismos anaeróbios facultativos e estritos.....</i>	<i>142</i>
<i>Tabela 5.26: Caracterização dos isolados, sobreviventes ao choque térmico 140°C/1'.....</i>	<i>144</i>

ÍNDICE DE FIGURAS

<i>Figura 3.1</i> Árvore filogenética baseada no alinhamento do 16S rRNA para reclassificação do gênero <i>Bacillus</i>	16
<i>Figura 3.2</i> :Estrutura do esporo.....	42
<i>Figura 5.1</i> . Resultado da contagem de Mesófilos Aeróbios Esporulados em linha de produção de requeijão.....	101
<i>Figura 5.2</i> Resultado da contagem Total de Termófilos Aeróbios Esporulados em linha de produção de requeijão.....	105
<i>Figura 5.3</i> Resultado da contagem esporos causadores de “Flat Sour” termofílico em linha de produção de requeijão.....	108
<i>Figura 5.4</i> Resultado da contagem Esporulados Acidúricos em linha de produção de requeijão.....	111
<i>Figura 5.5</i> Resultado de mesófilos anaeróbios esporulados expressos em % de tubos positivos de 6 inoculados dos Lote 1 e 2 em linha de produção requeijão.....	114
<i>Figura 5.6</i> Resultado de termófilos anaeróbios esporulados expressos em % de tubos positivos de 6 inoculados no Lote 1 e 2, na linha de produção de requeijão.....	117
<i>Figura 5.7</i> : Variação da média do pH durante a vida de prateleira de requeijão.....	121
<i>Figura 5.8</i> : Evolução da média da população de mesófilos aeróbios esporulados em requeijão durante a vida de prateleira.....	123
<i>Figura 5.9</i> : Evolução da média da população de termófilos aeróbios esporulados durante a vida de prateleira do requeijão.....	126
<i>Figura 5.10</i> Evolução da média da população de mesófilos anaeróbios esporulados em requeijão durante a vida de prateleira do requeijão.....	128
<i>Figura 5.11</i> : Evolução da média da população de termófilos anaeróbios esporulados em requeijão durante a vida de prateleira do requeijão.....	130

RESUMO

O objetivo desta pesquisa foi realizar um levantamento microbiológico da linha de processo de requeijão cremoso (pH 5,8) e avaliar sua vida de prateleira em função da sua contaminação por microrganismos esporulados e pelos patogênicos *L. monocytogenes*, *S. aureus* coagulase positiva e Coliformes (45°C), além de determinar o(s) sobreviventes ao processo térmico. Foram analisadas 50 amostras, de dois lotes distintos, o lote 1 produzido no inverno e o lote 2 no verão.

A detecção de *L. monocytogenes* foi realizada através do kit “Mini Vidas LMOII” (BioMerieux). As análises de quantificação de *S. aureus* coagulase e DNase positivo, de Coliformes, de *C. perfringens*, e de esporulados foram procedidas segundo método APHA – (American Public Health Association).

Não foi detectada contaminação por *L. monocytogenes*, *S. aureus* coagulase positiva, Coliformes (45 °C) e *C. perfringens* em nenhuma amostra de Produto Final. Assim, todas as amostras analisadas estavam de acordo com o regulamento técnico 82 do Mercosul, e com a regulamentação RDC-12 da Anvisa.

O ingrediente mais contaminado por esporulados mesófilos e termófilos anaeróbios e aeróbios, foi o Concentrado Protéico (4 log₁₀ esporos/10 g), seguido da massa Petit Swiss, em ambos os lotes. A carga destes ingredientes contaminados não foi totalmente eliminada pelo tratamento térmico. Foram contabilizados 207 isolados de esporulados do lote 1 e 270 do lote 2. O maior número isolados foram esporulados mesófilos aeróbios. Os ingredientes menos contaminados foram o Citrato

de Sódio e a água.

A média da contaminação das amostras do lote 2 produzido no verão foi maior e significativamente diferente ($p < 0.1$) daquela do lote 1 com relação aos seguintes grupos de esporulados: mesófilos aeróbios, termófilos causadores de “flat sour” acidúrico e mesófilos e termófilos anaeróbios. A carga do Concentrado Protéico apresentou maior efeito sazonal

A vida de prateleira foi acompanhada analisando 5 amostras/semana, de requeijão cremoso do lote 2, incubadas a 4°C por até 50 dias, sendo realizadas as mesmas análises microbiológicas citadas acima. Durante o estudo da vida de prateleira do requeijão cremoso em amostras do lote 2, não foi detectada contaminação por *L. monocytogenes*, *S. aureus* coagulase positiva e coliformes totais e fecais nem *C. perfringens*. Não foi observados sinal de alteração, na cor, odor e textura do produto.

Até o 22º dia de vida útil a produção de esporos de anaeróbios aumentou enquanto que os esporulados aeróbios se reduziram, sugerindo que este último grupo germinou, e consumiu o oxigênio residual do sistema. Após o 22º dia, a população de esporulados aeróbios aumentou pelo efeito adverso das barreiras temperatura e sorbato de potássio. Já os anaeróbios entraram em germinação tardia, no entanto, seu crescimento foi limitado pelas barreiras indicadas acima.

O processo térmico aplicado ao requeijão cremoso, não foi desenhado para eliminar a alta carga dos contaminantes esporulados, conseguindo apenas 1,3 reduções decimais na população de esporulados termófilos totais, no Produto de Linha do lote 2, devendo portanto, ser redimensionado com base na carga contaminante do

Produto de Linha (2,8 log₁₀ esporos/10g). Foi observado também um incremento de 1 ciclo log na população de esporulados mesófilos aeróbios do Produto Final envasado (lote 2) sugerindo possível contaminação da linha nesta seção

Foram isolados 325 esporulados durante toda a vida de prateleira do requeijão, sendo o maior número proveniente do 1º e do 22º dia de estocagem. Assim sendo, todos os isolados destas datas foram induzidos à esporulação “in vitro” para determinação do(s) sobrevivente(s) mais termoresistente(s). Cada um de 58 esporulados aeróbios estritos receberam choques térmicos sucessivos de 95°C/5', até 130 °C/3'. Apenas um isolado resistiu o choque 130°C/3'. De maneira análoga, 46 esporulados anaeróbios estritos e facultativos receberam choques de 130 °C/3' até 140 °C/1'. Sobreviveram ao último choque 30 isolados tendo predominância os *Bacillus* mesófilos anaeróbios facultativos (18 isolados) sendo estes na sua maioria capazes de coagular e hidrolisar a caseína, produzir proteólise e gás abundante

Não foi detectada deterioração após o ensaio de vida de prateleira a 4°C assim sendo a ação das barreiras físicas e químicas impostas ao produto foram suficientes para mantê-lo estável até o 50º dias de estocagem. No entanto, considerando a alta carga de esporulados, potencialmente deteriorante, este produto não pode ser submetidos a temperaturas de abuso de refrigeração durante sua distribuição e venda.

ABSTRACT

The objective of this research was to carry out a microbiological survey of Brazilian cream cheese “Requeijão” (pH 5,8), production line and to evaluate its shelf life, in relation to contamination by sporeformers and pathogens such as *L. monocytogenes*, coagulase positive *S. aureus* and Coliforms (45°C) and to determinate the microorganism(s), surviving the thermal process. Fifty samples, from two different lots were analyzed, lot 1 was produced during winter and lot 2 during summer .

The detection of *L. monocytogenes* was carried through with the "Mini Vidas LMOII" kit (BioMerieux). The essays for enumeration of *S. aureus* coagulase and DNase positive, Coliforms (45°C), *C. perfringens* and sporeformers were tested according to APHA methods – “American Public Health Association”.

No contamination of *L. monocytogenes* and coagulase positive *S. aureus*, Coliforms at 45°C and *C. perfringens* was observed in any of the samples of final product. Therefore all samples analyzed were in agreement to Mercosul Technical Regulation 82, and RDC 12 ANVISA resolution.

The most contaminated ingredient, with mesophilic and thermophilic anaerobic and aerobic sporeformers, was protein concentrate (4log₁₀spores/10g), followed by Petit Swiss mass, in both lots. The spore load from these contaminated ingredients was not totally eliminated after the thermal process. There were isolated 207 sporeformers from lot 1 and 270 from lot 2. The less contaminated ingredients

were sodium citrate and water.

The mean contamination from lot 2 samples was higher and significantly different ($p < 0,1$) than that of lot 1 in regard to the following groups of spore former : mesophilic aerobic, thermophilic aciduric flat sour producers and mesophilic and thermophilic anaerobic. The microbial load of protein concentrate from lot 2 showed highest seasonal effect.

During cream cheese shelf life studies, five samples from lot 2 per week, were incubated at 4°C for up to 50 days. The results from shelf life survey showed no contamination by *L. monocytogenes*, coagulase positive *S. aureus*, Coliforms at 45°C and *C. perfringens*. No alteration was observed on color, flavor and texture.

Until the 22th day of incubation, the anaerobic sporeformers increased in number while the aerobic sporeformers were reducing its population suggesting germination, and consumption of the package residual oxygen . After the 22th day, the sporulation of the aerobic sporeformers organisms increased by the adverse effect of temperature and potassium sorbate barriers, while the anaerobic sporeformers started late germination, nevertheless limited by the barriers indicated above.

The thermal process applied to Requeijão cream cheese was not dimensioned to eliminate the unexpected high contamination of the sporeformers organisms. This can be justified by the low decimal reductions, of only 1,3 log cycles , on the inline product population of total thermophilic sporeformers, from lot 2 . So, the commercial process had to be re-dimensioned on the basis of the contamination in the in line product from lot 2. It was observed also an increased in the final product mesophilic aerobic sporeformer population from lot 2 suggesting line contamination in

this section of the processing line .

There were isolated, 325 cultures during the shelf life studies. The largest number of these isolates came from 1st and 22th storage days; therefore, all isolates from these dates were induced to "in vitro" sporulation in order to determinate the most resistant microorganism(s) from the cream cheese. Each one of 58 aerobic sporeformers isolates were submitted to successive thermal shocks from 95°C/5 ' to 130°C/3 '. Only one isolate survived 130°C/3' heat shock. In the same manner, 46 strict and facultative anaerobic sporeformers received thermal shocks from 130°C/3' to 140°C/1'. Thirty isolates survived the last heat shock. The facultative anaerobic mesophilic sporeformers predominated among the survivors (18 isolates) most of them were able to coagulate and hydrolyze casein, to produce proteolysis and liberate gas.

As it was not detected deterioration after shelf life monitoring at 4°C it was concluded that the temperature and antibacterial hurdles were efficient to maintain the final product stable up to 50 days. However, considering the high sporeformers contamination, which can potentially deteriorate the final product, Requeijão cream cheese can not be submitted to abuse refrigeration temperatures, during its sale and distribution.

1. INTRODUÇÃO

A indústria de queijos fundidos é uma ramificação relativamente recente da indústria de laticínios, já que os primeiros experimentos relativos à fusão de queijos foram realizados na Suíça há pouco mais de 80 anos. O comércio de queijos fundidos à base de queijo Emmental foi iniciado em 1911 pela Sociedade Gerber Käse AG em Thun, Suíça. Independente disto, a fusão de queijos começou também a ser realizada nos Estados Unidos, utilizando outras variedades de queijos, além do Emmental, como matéria-prima para o processo. A França e Alemanha iniciaram a produção de queijos fundidos em 1919 e 1922, respectivamente. A partir daí, esta indústria se desenvolveu consideravelmente, sendo hoje, um setor importante no ramo de laticínios.

Dentre os queijos fundidos produzidos e comercializados no Brasil, o requeijão cremoso é o mais tradicional, sendo um queijo tipicamente brasileiro, originário de fabricações caseiras como forma de aproveitamento do leite coagulado em função da ação da microbiota láctica natural do leite. O princípio da fabricação destes tipos de queijos consiste em fundir os dois elementos principais do queijo, isto é, gordura e proteína.

Em 2005, pelas estimativas da ABIQ, foram produzidas 34.000 toneladas de Requeijão Cremoso e 100.000 toneladas de Requeijão Culinário, que somadas ultrapassam as 113.000 toneladas de Queijo Prato e perderam somente para as 159.000 toneladas de Mussarela, se constituindo, assim, no segundo queijo mais produzido no Brasil.

A qualidade dos queijos fundidos é determinada por diversos atributos de

natureza física, química, nutricional, sensorial e microbiológica. A escolha do queijo destinado à fusão é a etapa mais importante na fabricação de queijos processados, pois exerce influência decisiva no processo e nas principais características do Produto Final, principalmente com relação ao aspecto, gosto, consistência, estrutura e conservação. Portanto, a qualidade do queijo fundido é determinada em grande parte, pela qualidade da matéria-prima, razão pela qual a seleção da mesma deve estar baseada principalmente na qualidade desejada para o Produto Final.

Poucas bactérias não esporuladas sobrevivem às temperaturas de fusão do requeijão. Em condições normais de acidez e concentração salina estes microrganismos não encontram ambiente favorável para o seu crescimento. Entretanto, pode ocorrer tanto o crescimento de esporulados aeróbios como *Bacillus subtilis*, *Bacillus mesentericus*, *Bacillus coagulans* e *G. stearothermophilus*, quanto esporulados anaeróbios como espécies de *Clostridium*. Esporos de bactérias são extremamente resistentes à temperatura, pH, radiação UV, ação enzimática, ácidos orgânicos, e podem permanecer dormentes durante longos períodos. A sobrevivência bem sucedida de um microrganismo esporulado depende da habilidade desse sistema dormente (endósporo inativo) ser ativado, germinar, crescer e se multiplicar em condições favoráveis para o seu desenvolvimento. Desta forma, bactérias esporuladas constituem um problema especial para a indústria de alimentos.

A presença de termófilos aeróbios esporulados em ingredientes é de interesse pelo seu potencial deteriorante em alimentos processados. Tanto a presença de microrganismos termófilos quanto a linhagem em questão são revelantes em função da diferença da resistência térmica do microrganismo envolvido.

Em função das condições de anaerobiose observadas nos queijos fundidos é de se esperar que espécies do gênero *Clostridium* cresçam com maior frequência, produzindo estufamento tardio, geralmente entre 10 dias até dois meses após o

processamento.

A fermentação butírica em queijos está comumente associada ao estufamento tardio causado pela germinação dos esporos de *Clostridium* presentes em leite cru proveniente da silagem, podendo causar perdas consideráveis na comercialização do produto, especialmente na produção de queijos. Além da grande quantidade de ácido butírico formado, ocorre também a rancificação e perda da consistência do produto. Apesar de *Clostridium tyrobutyricum* ser a linhagem mais freqüentemente associada ao estufamento tardio de queijos, esporos de outras linhagens também podem ser isolados de queijos processados, não processados e de leite cru, como por exemplo, as linhagens de *C. beijerinckii*, *C. butyricum* e *C. sporogenes*.

Nesta pesquisa investigou-se a qualidade microbiológica de um tipo de requeijão cremoso em relação à contaminação por microrganismos patogênicos e não patogênicos esporulados. O enfoque principal foi dada aos esporulados, pois estes podem provocar a deterioração do requeijão durante sua vida de prateleira, mudando as características organolépticas, tais como cor, textura, odor e sabor.

Não foram encontrados na literatura Nacional e/ou Internacional dados sobre levantamento de microrganismos deteriorantes esporulados em requeijão, sendo portanto, esta pesquisa inédita a este respeito, e com extrema relevância para a indústria nacional do setor.

2. OBJETIVOS

- Avaliar a contaminação de requeijão cremoso por microrganismos esporulados termófilos e mesófilos, aeróbios e anaeróbios, e por microrganismos patogênicos indicadores tanto nos ingredientes como no produto em linha de produção e no Produto Final a partir dois lotes, sendo o primeiro produzido no inverno e o segundo no verão.
- Acompanhar a evolução da população deteriorante esporulada durante a vida de prateleira do requeijão produzido no lote 2.
- Estabelecer o(s) microrganismo(s) contaminante(s) que sobrevive(m) ao processo térmico e consegue(m) crescer e germinar durante a vida de prateleira do Produto Final a partir do lote 2.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 O Requeijão

A tecnologia dos queijos fundidos surgiu no início do século XX, como uma necessidade de retardar os processos deteriorantes microbianos e enzimáticos de queijos suíços e alemães, a fim de viabilizar a exportação para países de clima quente. Em 1911, Gerber e Stettler conseguiram solubilizar o paracaseinato de cálcio da matéria-prima por meio de calor, usando Citrato de Sódio como agente fundente, obtendo assim o que foi chamado de queijo processado. O sal sódico, sob agitação constante e calor, promove uma troca interna de íons, transformando o paracaseinato de cálcio, de hidratação instável, em paracaseinato de sódio, cuja solução coloidal é estável (Garruti et al, 2003).

Segundo Oliveira, 1986, qualquer queijo cujas características da massa revelem uma destruição completa da estrutura original do coágulo, pode ser classificado como queijo de massa fundida envolvendo a fusão da gordura e proteína (Van Dender, 2001).

Do ponto de vista legal, os queijos processados ou fundidos devem cumprir os critérios estabelecidos no Regulamento Técnico Geral Para a Fixação dos Requisitos Microbiológicos de Queijos (Portaria no. 146 de 07/03/1996 do Ministério da Agricultura do Estabelecimento e da Reforma Agrária) e no Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Queijo Processado ou fundido, Processado

Pasteurizado e Processado ou Fundido UHT (Portaria no. 356 de 04/09/1997). De acordo com esta última portaria entende-se por queijo processado *o produto obtido por trituração, mistura, fusão ou emulsão por meio de calor e agentes emulsificantes de uma ou mais variedades de queijos, com ou sem adição de outros produtos lácteos e/ou sólidos de origem Láctea e/ou especiarias, condimentos ou outras substâncias alimentícias na qual o queijo constitui o ingrediente lácteo utilizado como matéria prima preponderante na base láctea.* (citado por Van Dender, 2001).

Segundo a Associação Brasileira das Indústrias de Queijo (Gigante, 1998), dentre os queijos fundidos produzidos e comercializados no Brasil, o requeijão cremoso é o mais tradicional. O requeijão é um queijo tipicamente brasileiro, originário de fabricações caseiras, como forma de aproveitamento do leite coagulado espontaneamente devido à ação da microbiota láctica natural do leite. É fabricado a partir de leite desnatado cru ou pasteurizado, com ou sem adição de culturas lácticas, sendo a utilização do leite desnatado uma prática proveniente da época em que a manteiga era o derivado mais valorizado do leite. Assim sendo, pequenas fábricas semi-artesaniais que dispunham de uma desnatadeira, separavam o creme e, o leite desnatado resultante era deixado coagular espontaneamente, para obter a massa que era então transformada em requeijão (Van Dender, 2002). Segundo Van Dender, 2001, não é permitido usar a denominação “requeijão” para designar produtos cuja base láctea contenha gordura e/ou proteína de origem não láctea. Portanto os queijos elaborados com adição de gordura vegetal ou com teor de gordura reduzido deverão seguir a Portaria no. 27 de 13/01/1998 da Secretaria da Vigilância Sanitária do Ministério da Saúde. Convém também salientar que não é permitido o uso de espessantes/estabilizantes na fabricação de requeijões. No entanto, os mesmos

efeitos de estabilização e espessamento podem ser obtidos com a adição de caseinatos e concentrados protéicos. (Van Dender, 2001). De acordo com Garruti, (2003) a composição de um requeijão cremoso típico consiste de 58-60% de água, 24-27% de gordura, 9-11% de proteína, 1-2% de carboidratos e 1-1,5% de NaCl.

No Brasil, para a produção de massa destinada à fabricação de requeijão cremoso, a indústria tem utilizado principalmente três processos: o tradicional, onde a fermentação é feita por meio de fermentos lácticos, a acidificação direta (com ácido láctico 85% ou acético) do leite aquecido e a coagulação enzimática. Já existe no mercado nacional, requeijão cremoso fabricado a partir de retentado obtido por ultrafiltração de leite nas modalidades tradicional, "light", zero de gordura e com diversos sabores (Van Dender, 2002).

Amplamente consumido no Brasil, sobretudo nos grandes centros, embora seja encontrado em qualquer lugar, é um substituto da manteiga em muitos casos, por ser um produto mais digerível, com menor teor de colesterol, muito saboroso, além da versão "Light". A adequada tecnologia e a embalagem com bom fechamento, que permite o envase a quente do requeijão, possibilita o seu transporte a longas distâncias (Santos, 2002).

Inicialmente a indústria do queijo fundido funcionou em grande parte como absorvedora do queijo não comercializado e retornado às indústrias, conseqüentemente, tornava-se inviável a manutenção da qualidade do produto obtido. Atualmente, com o crescimento do mercado, a indústria tem preparado a matéria-prima para a fabricação do produto (Gigante, 1998).

Atualmente, para a elaboração de queijo fundido é feita uma mistura de queijo, água e sais emulsificantes com posterior a pasteurização da mistura para obtenção do Produto Final. Tal produto deve ter fluidez suficiente para ser envasado convenientemente, devendo manter suas características durante o armazenamento e ao longo de toda cadeia de distribuição e comercialização (Van Dender, 2006).

Alguns dos defeitos mais comuns em queijos fundidos cremosos são: consistência granulada; fluidez heterogênea; fluidez excessiva; emulsão brilhosa ou com separação de gordura; descoloração ou escurecimento do produto; textura arenosa, cristalizada; defeitos de sabor, como fraco, picante, amargo, rançoso, ácido, químico, alcalino e metálico (Garruti *et al*, 2003). Também tem sido reportado pelos consumidores o aparecimento de odor putrefativo, sendo um indicativo de ocorrência de atividade proteolítica.

3.1.1. Mercado Nacional de Requeijão

O consumo de requeijão pode ser dividido em duas fases distintas, a primeira no período entre 1975 e 1999, quando os tipos mais comercializados eram o Requeijão Cremoso (o mais consumido), o Requeijão do Norte (provavelmente o mais antigo e muito consumido nos estados nordestinos) e o Requeijão em Barra (o de menor consumo). Com raras exceções, o consumo nesse período, era à mesa com pães e biscoitos no café da manhã ou no chá da tarde, e esporadicamente em receitas caseiras. Já a segunda fase, entre a década de 90 até os dias atuais, ampliou o consumo do produto pelo crescimento dos “Fast-Foods”, das comidas prontas e a grande utilização do requeijão em pizzas, pastéis, esfihas, massas, entre outros pratos, gerando a necessidade da produção um tipo de requeijão que suportasse altas

temperaturas e que tivesse um sabor mais pronunciado. Este perfil de mercado era dominado pelo Requeijão tipo Catupiry e por outros poucos que tentavam imitá-lo. Surgiu assim, o Requeijão Culinário, comercializado em grandes embalagens tais como baldes, sacos e bisnagas, sendo responsável por um aumento ainda maior no consumo e na produção de requeijões (Van Dender, 2006).

Pelos dados da DATAMARK (www.datamark.com.br, 2004), citado por Van Dender (2006), a produção de Requeijão Cremoso foi de 31.350 toneladas, 7,42% a mais que em 2003, sendo que 23.324 toneladas, ou 74,40%, foram produzidos na Região Sudeste, 3.668 toneladas, ou 11,70% na Região Sul e as restantes 4.358 toneladas nas demais regiões do Brasil. O Estado de São Paulo produziu 12.979 toneladas, o que representa 41,40% do total produzido no país e 55,65% da produção de Requeijão cremoso da Região Sudeste.

Segundo Van Dender, 2006, dados do IBGE, MDIC, ABLV e ABIQ, dos 23,5 bilhões de litros de leite produzidos no Brasil em 2004, 553 milhões de litros foram destinados para a produção de requeijão, ou seja, 2,35% da produção total. Este número passa para aproximadamente 4% quando se analisa somente os produtos sob inspeção, pois existe uma estimativa de 40% do total de leite produzido seja consumido de maneira “informal”. O requeijão representa 16,37% dos 3,377 bilhões de litros destinados à produção de queijos inspecionados. É o quinto produto sob inspeção (em litros de leite) mais consumido, ficando atrás somente do Leite UHT, Leite em Pó, Leite Pasteurizado e do queijo Mussarela, nesta ordem.

Segundo o Jornal Econômico de 9 de Junho de 2005, o segmento “Requeijão” movimentou em 2004 em torno de R\$ 454 milhões, 3,6% a mais do que

em 2003, o que reforça a expansão do mercado. (Van Dender, 2006)

Pelos dados da DATAMARK (www.datamark.com.br), 2004 a produção de Requeijão Cremoso foi de 31.350 toneladas, 7,42% a mais que em 2003, sendo que 23.324 toneladas, ou 74,40%, foram produzidos na Região Sudeste, 3.668 toneladas, ou 11,70% na Região Sul e as restantes 4.358 toneladas nas demais regiões do Brasil. O Estado de São Paulo produziu 12.979 toneladas, o que representa 41,40% do total produzido no país e 55,65% da produção de Requeijão cremoso da Região Sudeste.

No Brasil a empresa Danone com a marca Poços de Caldas lidera a venda de Requeijão Cremoso abrangendo 34,40% do mercado, seguida pela Itambé com 21,00% com a marca de mesmo nome, seguida da Vigor com 14,20% com as marcas Danúbio, Leco e Vigor, e em quarto e quinto lugares a Bongrain com a marca Polenghi (12,80%) e a Nestlé (12,60%), respectivamente. As demais marcas completam os restantes 5%. (Van Dender, 2006)

3.1.2. Requeijão x Especialidade Láctea

A empresa Danone foi uma das primeiras, senão a primeira a colocar o seu produto, com a marca de Poços de Caldas, em copos plásticos alterando sua formulação para o que se denominava “Especialidade Láctea” com isso percebeu a receptividade do público ao preço final mais acessível (Van Dender, 2006).

A diferença entre especialidade láctea e o requeijão tradicional é que na primeira, parte da gordura animal é substituída por gordura vegetal e para melhorar a textura adiciona-se amido. Dessa forma, as especialidades lácteas são um pouco

menos calóricas e possuem quase o dobro de carboidratos, já que contêm amido (Pró -Teste, 2005).

A decisão de criar este novo produto, se deu em outubro de 2003, e ao se comparar o consumo dos 3 meses posteriores às mudanças, constatou-se um acréscimo de 30% nas suas vendas. Porém, com as denúncias e polêmicas divulgadas na mídia sobre as diferenças entre as formulações, a Danone retomou em 2006 a fabricação de seus requeijões Tradicional e “Light”, abandonando as Especialidades Lácteas (Van Dender, 2006).

Outras fabricantes como a Nestlé e a Vigor seguiram os passos da Danone e passaram também para os copos plásticos com o lançamento de novas formulações. A Nestlé lançou a Especialidade Láctea Tradicional e “Light” e até início de 2006 não fabricava mais o Requeijão Cremoso puro. Já a Vigor, manteve sua linha de produtos Danúbio nas formulações e embalagens tradicionais e lançou Especialidades Lácteas em copos de vidro e de plástico com as marcas Leco e Vigor respectivamente até final de 2005. Entretanto retornou aos requeijões tradicionais no início de 2006, parando também de fabricar as especialidades lácteas. A Itambé, segunda do “ranking” de vendas, ainda não aderiu às mudanças (Van Dender, 2006).

É importante salientar que a denominação “Especialidade Láctea” foi abolida em 2005, e os produtos contendo amido ou gordura vegetal devem ser denominados REQUEIJÃO CREMOSO COM GORDURA VEGETAL E COM AMIDO devendo o nome vir completo e em destaque (Van Dender, 2006).

3.1.3. Classificação dos tipos de requeijão

Com o nome de requeijão, existem no mercado queijos com diferentes teores de umidade e, conseqüentemente, consistência específica, desde produtos bem cremosos, até produtos bastantes firmes até mesmo fatiáveis. O mesmo acontece com o teor de gordurano produto, que pode variar desde 59%, quase como um creme fermentado, até requeijões praticamente sem gordura. Não existe, portanto, um padrão fixo de gordura e umudad e sim uma faixa conforme tabela 1

Tabela 1: Requisitos físicos químicos do requeijão.

Requisito	Requeijão	Requeijão	Requeijão	Métodos de análises
	Min/Max	Cremoso Min/Max	Manteiga (Norte) Min/Max	
Matéria gorda no extrato seco (g/100g)	45,0 /54,9	Max.: NI**	25,0 / 59,9	Norma FIL 5B: 1986
		Min.: 55,0		
Água (g/100g)	Max 60,0	Max.: 65,0	Max 58,0	Norma FIL 4 ^A : 1986
	Mín.: NI	Min.: NI	Min NI	

Mercosul, GMC/ RESOLUÇÃO 82, 1996..

**NI = Não indicado

De acordo com as matérias primas empregadas no processo de elaboração os queijos fundidos se classificam em (Mercosul, 1996):

- Requeijão: Obtido por fusão de mistura de coalhada dessorada e lavada obtida por coagulação ácida e ou enzimática do leite com ou sem adição de creme de leite e ou manteiga e ou gordura anidra de leite ou "butter oil".

- Requeijão Cremoso: Obtido por fusão de uma de coalhada dessorada e lavada obtida por coagulação ácida e ou enzimática do leite com adição de creme de leite e ou manteiga e ou gordura anidra de leite ou butter oil.
- Requeijão de Manteiga (Requeijão do Norte): Obtido por fusão prolongada com agitação de uma mistura de manteiga e massa de coalhada de leite integral, semi desnatado ou desnatado e NaCl.

É importante ressaltar que os três tipos de requeijão te como ingrediente obrigatório leite ou leite reconstituído, já o requeijão cremoso deve ser m su composição, creme e/ou manteiga e/ou gordura anidra de leite ou “butter oil” e o requeijão manteiga deverá ter leite ou leite reconstituído, manteiga e cloreto de sódio. Como ingredientes opcionais pode-se adicionar: coalho, coagulantes apropriados, creme, manteiga, gordura anidra de leite ou “butter oil”, sólido de origem láctea, leite em pó, caseína, caseinatos, cloreto de sódio, cloreto de cálcio, fermentos lácteos ou cultivos específicos, condimentos, especiarias, outras substancias alimentícias (Mercosul, 1996).

3.2. Características dos principais microrganismos deteriorantes de Queijos Fundidos

Poucas bactérias não-esporuladas sobrevivem às temperaturas de fusão dos queijos fundidos (80°C/ 20-30minutos). Entretanto, pode ocorrer tanto a germinação quanto crescimento de esporulados aeróbios, como *Bacillus subtilis*, *B. mesentericus*, *B. coagulans* e *G. stearothermophilus*, quanto anaeróbios de como

espécies de *Clostridium*. Em função das condições de anaerobiose observadas nos queijos fundidos, é de se esperar que espécies do gênero *Clostridium* cresçam com maior frequência no entanto não podem ser descartadas espécies de *Bacillus* facultativos (Moreno et al, 2002^b),.

Estes esporos de bactérias podem atingir os ingredientes de alimentos processados através do solo, além disso a utilização de alimentos crus e de ingredientes contaminados também pode ser um veículo de contaminação (Olson & Sorrells, 2001).

3.2.1. Características do gênero *Bacillus*

3.2.1.1. Reclassificação do gênero *Bacillus*

A classificação do gênero *Bacillus* foi feita por Smith, Gordon e Clark, 1946, citado por Ash *et al*, 1994, nesta época qualquer microrganismo que possuísse o formato de um bastonete era descrito como espécie do gênero *Bacillus*. Em 1949, Gordon e Smith, simplificaram esta classificação, envolvendo 206 linhagens, 46 das quais eram mesofílicas. O restante foi dividido em 2 grupos termofílicos: *B. stearothermophilus* e *B. coagulans*. Nas 3 décadas seguintes se chegou à conclusão que os bacilos termofílicos constituíam um grupo diverso. Quando os taxonomistas moleculares analisaram o gênero *Bacillus* ficou evidente que a classificação tradicional “esporulados aeróbios produtores de endosporos”, mesmo sendo conveniente do ponto de vista prático, não levava em consideração as relações filogenéticas. Na década de 90, a tecnologia de sequenciamento e análises da seqüência 16S rRNA levaram Ash *et al* (1994) a concluir que existiam 5 grupos distintos que poderiam ser

classificados como gêneros diferenciados (Zeigler, 2001.)

Mais recentemente outros grupos têm proliferado, levando à classificação (conforme Figura 1) entre os diversos novos gêneros, podemos citar: *Paenibacillus* (quase um *bacillus*,) envolvendo anaeróbios facultativos e mesófilos, *Brevibacillus* (*bacillus* curtos) quase todos aeróbios e mesofílicos, *Virgibacillus* (ramificação dos *bacillus*) mesofílicos moderadamente aerotolerantes, *Alicyclobacillus* (contendo ácido graxo cíclico na parede) acidófilos, moderadamente termofílicos entre outros. No caso alguns, termofílicos foi incluídos no gênero do *Geobacillus* por sua origem ser proveniente do solo.

O novo gênero *Geobacillus* pertencente à família *Bacillaceae*, pode ser explorado biotecnologicamente por apresentar características extremamente interessantes, como termofília e halofilia (Zeigler, 2001.)

O grupo de *Geobacillus* inclui as espécies *G. stearothermophilus*, *G. kautophilus*, e *G. thermoglucosidaceo*. *G. subterraneus*, entre outros.

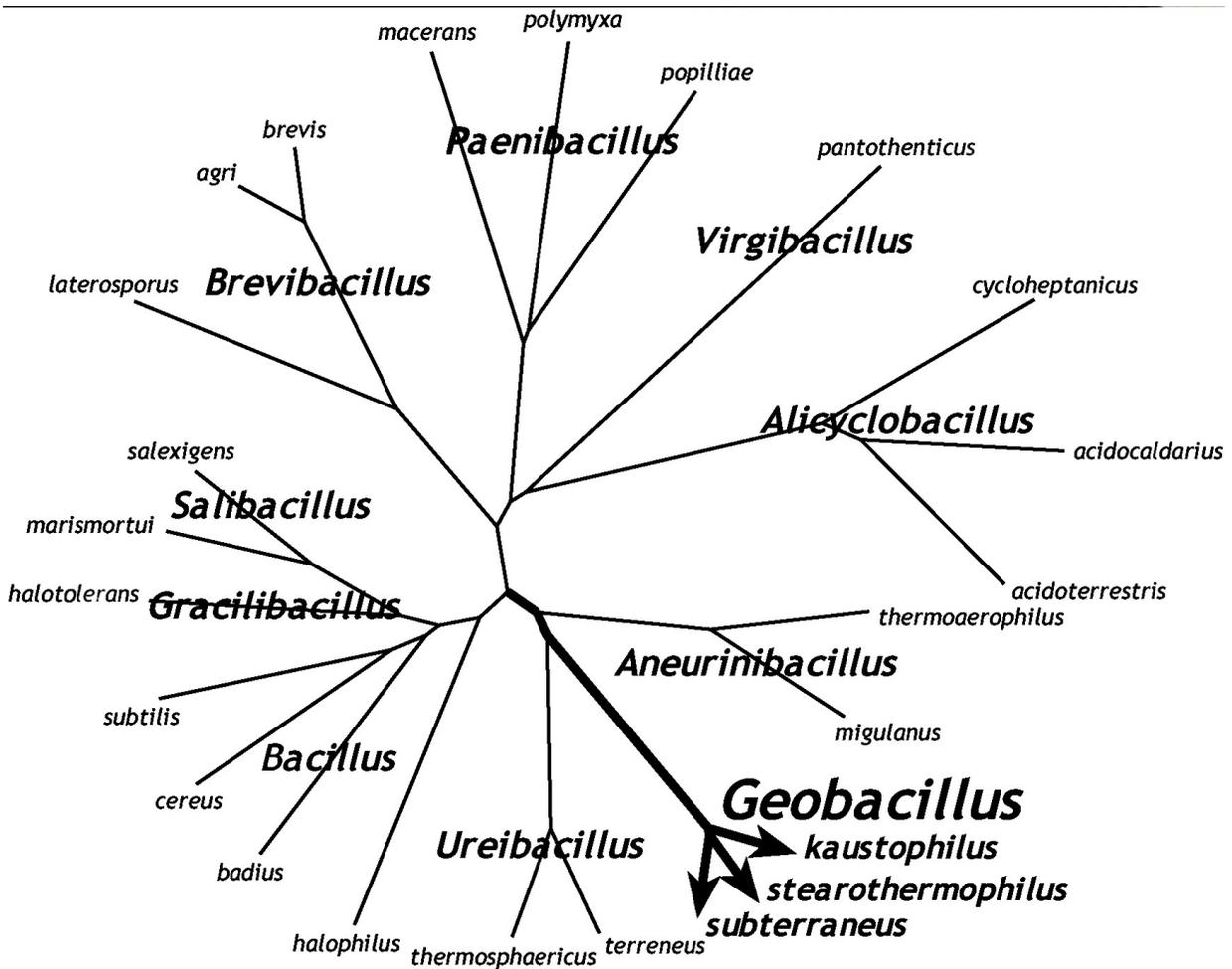


Figura 3.1 Árvore filogenética baseada no alinhamento do 16S rRNA para reclassificação do gênero *Bacillus*

3.2.1.2. Gênero *Bacillus*

Os membros do gênero *Bacillus* são aeróbios ou anaeróbios facultativos, característica que permite diferenciá-los dos membros do gênero *Clostridium* e *Desulfotomaculum*, obrigatoriamente anaeróbios. Além desta característica, os microrganismos do gênero *Bacillus* são geralmente, produtores de catalase, diferentemente dos microrganismos do gênero *Sporolactobacillus*, que não são produtores de catalase e são microaerófilos e dos *Clostrídios* que são anaeróbios

estritos e catalase negativa. (Stadhouders, 1992). Os *Bacillus* são bastonetes grandes, medindo aproximadamente 1,0 a 7,0 µm de comprimento, Gram +, móveis em sua maioria, com flagelação peritríquia. São quimio-heterotróficos, ou seja, versáteis no aproveitamento metabólico de substratos orgânicos; alguns são proteolíticos, outros lipolíticos e amilolíticos. Produzem anaerobicamente ácido a partir de açúcares, sendo que poucos produzem gás sendo a maioria saprófita (Massaguer, 2006). O pH mínimo para multiplicação pode variar de 2,0 a 8,0, a tolerância ao sal pode ser pequena (2%) ou alta (25%). Determinadas espécies produzem diferentes tipos de enzimas responsáveis por diversas alterações no leite e derivados. Embora o leite não seja um bom meio para a germinação de esporos de *Bacillus*, estes estão presentes em biofilmes, que se formam na superfície de equipamentos não higienizados adequadamente, oferecendo condições ideais para germinação (Van Dender, 2006). Quando o leite é submetido à pasteurização, as células vegetativas são destruídas, sendo os esporos a forma termoestável. Sob condições ideais, estes germinam e crescem nos produtos acabados. Na atual classificação *Bacillus cereus*, *B. subtilis* e *B. badius* fazem parte do gênero *Bacillus*.

3.2.1.3. Características da espécie *B. cereus*

De acordo com FDA (1998), citado por Pacheco-Sanchez, (2005), *Bacillus cereus* constitui-se de um bastonete grande disposto em cadeias curtas e/ou longas, com esporos elipsoidais, na posição central a subterminal sem intumescimento do esporângio. É aeróbio facultativo, com pH de crescimento entre 4,9 e 9,3; é um mesofílico típico com temperatura máxima de crescimento entre 48-50°C e mínima entre 4-5.°C (FDA, 1998).

Bacillus cereus pode produzir dois tipos de toxinas, do tipo emético (intoxicação) e o diarréico (toxinfecção) aparentemente diferentes, em alimentos contaminados com concentrações maiores que 10^6 UFC/g (Kramer & Gilbert, 1989; Drobniewski, 1993; Granum, 1994).

A toxina diarréica é produzida na fase exponencial e, principalmente na fase estacionária do crescimento. Algumas linhagens de *B. cereus* produzem a toxina quando submetidas a temperaturas de 4°C, outras entre 6 e 21°C. Se o alimento é ingerido, quando a célula vegetativa se lisa no intestino, a toxina é liberada. Neste caso, os sintomas da intoxicação são dores abdominais constantes e diarréia fraca após 4 a 16 horas da ingestão, permanecendo por até 24 horas, mas sem febre (Jay, 1992)

A toxina emética apresenta baixo peso molecular (5.000da), sendo estável frente à variação de pH e de temperatura. Sua produção ocorre durante a esporulação do microrganismo cujas linhagens apresentam temperatura ótima de crescimento entre 35-40°C. A síndrome emética é mais grave e mais aguda. A incubação varia de 1 a 6 horas com duração de 5 horas (Jay, 1992; FDA, 1998).

Além de infecções de origem alimentar, este microrganismo pode ser responsável pela degradação de leites e cremes, devido a possuir enzimas similares à renina levando a proteólises (Rusul e Yaacob, 1995).

De acordo com a resistência térmica do *B. cereus*, Parry & Gilbert (1980) reportaram valores D_{95° entre 2,5 e 36,2 minutos, em tampão fosfato, para cepas de *B. cereus* isoladas de diversos alimentos que provocaram intoxicação emética nos

consumidores. Neste caso, ampla faixa de variação do valor D foi verificada atestando como a resistência térmica do microrganismo pode variar em função do alimento que contamina. De acordo, Johnson *et al*, (1982) encontraram valores $D_{85^{\circ}\text{C}}$ entre 32,1 e 106 minutos com z variando entre 6,8 e 13,9°C.

3.2.1.4. Características da espécie *B. coagulans*:

B. coagulans é um microrganismo não patogênico, móvel através da presença de mais de 10 flagelos por célula e formador de esporos. É comumente encontrado no solo, tendo sido isolado de polpa de tomate, cremes, leite evaporado, queijo e silagem. Deterioração e subsequente coagulação de leite evaporado são causadas por este microrganismo, determinando assim, o seu nome. O pH ótimo para o seu crescimento varia entre 5,0 e 7,0. Para a determinação da temperatura ótima de crescimento, Gordon e Smith, (1949), estudaram 73 culturas sendo que 100 % delas cresciam entre 33- 45°C, 98,6% cresciam a 50°C e 90,4% cresciam a 55°C, porém nenhuma delas crescia a 65°C, sendo o crescimento a esta temperatura considerado diferencial com relação a *G. stearothermophilus*. Mais recentemente, em 1981, Thompson classificou este microrganismo como “termófilo facultativo” com uma faixa de crescimento médio de 20°C a 55°C.

Esta espécie pode ser identificada através dos seguintes ensaios bioquímicos, dos quais seus resultados indicados:

- ✓ Teste de Catalase: positivo,
- ✓ Teste de Voges-Proskauer: positivo,
- ✓ Crescimento em anaerobiose sem a presença de glucose: positivo,

- ✓ Crescimento a 50°C: +,
- ✓ Ausência de crescimento em produtos com alto teor de Cloreto de Sódio (7% NaCl) (Evancho & Wall, 2001).

O *B. coagulans* tem uma resistência aproximada $D_{120^\circ} = 2,3$ minutos, $a_w > 95$ e pH 7,0 (Mossel et al, 1995)

3.2.1.5. Características da espécie *B. sporothermodurans*

Caracteriza-se por ser estritamente aeróbio, e não produzir ácido a partir de açúcares. (Pettersson *et al.*, 1996)

Este organismo tem sido isolado no mundo todo como contaminante do leite processado pelo sistema UHT, não é patogênico, e seu metabolismo é lento, atingindo populações de 10^5 /ml de leite UHT, a 30°C em 5 dias. Sua incidência também é observada em produtos à base de leite em pó (Hammer *et al.*, 1995). No entanto não apresenta atividade deteriorante.

A resistência deste microrganismo foi determinada à temperaturas de 110 a 145 °C num esterilizador (Huemer et.al, 1998) de aquecimento direto atingindo valores: $D_{140C} = 3,4-7,9$ sec, resistência excepcionalmente alta se comparada com *G.stearothermophilus* : $D_{140C} = 0,9$ sec. O valor de Z deste organismo foi de 13.1 – 14.2°C.

3.2.1.6. Características da espécie *G. stearothermophilus*

São bastonete Gram positivos + ou Gram variável, em arranjos simples ou

cadeias curtas, com motilidade mediante flagelos peritríquios. Os endosporos são elipsóides ou cilíndricos com localização terminal ou subterminal e esporângio levemente entumescido ou não. São aeróbios ou anaeróbios facultativos e termófilos obrigatórios.

Este microrganismo apresenta a característica de fermentar carboidratos com a subsequente formação de ácidos graxos de cadeia curta, causando a acidificação do produto sem a produção de gás e por isso, sem causar deformação na embalagem. Apesar de ser considerado obrigatoriamente termófilico, na prática células vegetativas podem crescer na faixa de 37 à 75°C com ótimo a 55-65°C e faixa de pH entre 6,0 e 8,5. A grande maioria produz catalase. Apresentam reação de Voges – Proskauer negativa e produzindo ácido lático sem gás a partir da frutose, glucose, maltose, manose e sacarose,

Esporos de *G. stearothermophilus* são extremamente resistentes ao calor, apresentando o valor $D_{121^{\circ}\text{C}}$ entre 4 e 5 minutos e um valor Z entre 7,8-12,2°C, apresentando alta resistência também à produtos químicos, sendo assim, os esporos são de difícil destruição quando presentes tanto no alimento como na linha de processamento (Zeigler, 2001).

A manutenção do alimento a 43-75 °C durante o processamento, pode servir como uma fonte para o acúmulo excessivo de esporos deste microrganismo, que, devido à sua alta resistência térmica, não são eliminados durante o tratamento térmico aplicado. O esfriamento inadequado do produto após tratamento térmico também contribui para o desenvolvimento da deterioração “*Flat Sour*” no Produto Final.

Métodos para minimizar a contaminação por *G. stearothermophilus*, incluem o controle da contaminação destes microrganismos em ingredientes e em produtos que entram na linha de produção, além da sanitização correta dos equipamentos, e das superfícies que entram em contato com o alimento (Olson & Sorrells, 2001).

3.2.1.7. Características da espécie *B. subtilis*

Citado por (Carvalho Filho, 1996), Berkeley e Gordon, classificaram as 71 linhagens de *B. subtilis* em 5 características para identificação:

- ✓ Tamanho: Geralmente de 0,7 – 0,8 µm por 2,0 – 3,0µm, Gram positivo, apresentando motilidade,
- ✓ Forma do esporo: Elipsoidal, cilíndrico, central para central,
- ✓ Temperatura de crescimento: Temperaturas máximas de 45°C a 55°C e temperaturas mínimas de 5°C a 20°C, sendo a temperatura ótima em torno de 28 a 40°C,
- ✓ Reações positivas: Catalase, Voges-Proskauer, crescimento em 7% de NaCL, crescimento em pH de 5,0 – 8,0, produz ácido a partir de glicose, arabinose, xilose (4 linhagens negativas) e manitol, hidrólise de amido, utilização de citrato como fonte de carbono, redução de nitrato a nitrito, decomposição da caseína.
- ✓ 'Reações negativas: Crescimento anaeróbio, reação em meio de gema de ovo com produção de pigmento preto a partir de glicose (4 linhagens positivas) e a partir de tirosina (1 linhagem positiva),

hidrólise de hipurato, utilização de propionato, decomposição de tirosina).

3.2.2. Características do gênero *Clostridium*

O gênero *Clostridium* compreende mais de 100 espécies anaeróbias, com exceção de 4 espécies que são anaeróbias facultativas. (Prevot, 1965)

São bastonetes Gram positivos, formadores de esporos , não produzem catalase, com exceção de algumas espécies aerotolerantes, são anaeróbios estritos. Podem ser encontrados em diversos sedimentos e no trato gastrintestinal do homem e animal. Seus esporos estão presentes no solo, poeira, forragem, água, animais e seus excrementos e, principalmente, na silagem que constitui fonte potencial de contaminação de leite cru (Van Dender, 2006).

A presença destes esporos no leite pode gerar fermentação butírica em queijos implicando em estufamento tardio nas embalagens com conseqüente perda na comercialização do produto. Outros efeitos do desenvolvimento destes microrganismos esporulados são: rancificação, perda da consistência do produto, putrefação e proteólise.

Os clostrídios que causam a fermentação butírica são normalmente denominados de bactérias ácido butíricas, sendo *C. tirobutyricum*, *C. butyricum*, *C. perfringens*, *C. sporogenes* e *C. bifermentans*, as principais espécies. O defeito mais relevante e economicamente mais importante, causado por esse grupo, é o estufamento tardio (Van Dender, 2006).

Os *clostrídios butíricos* encontram as condições ideais de desenvolvimento em queijos, requeijões e outros queijos fundidos: anaerobiose, baixa acidez, temperatura moderada (10 a 30 °C). A produção de gás é importante, sendo sintetizadas duas moléculas de hidrogênio para cada molécula de lactato degradada, o que provoca um estufamento excessivo dos queijos que podem chegar a estourar. Além disso, o ácido butírico e o hidrogênio dão origem a sabores e odores desagradáveis.

Embora o *C. butyricum* também pertença a este grupo, o *C. tyrobutiricum* é, na maioria dos casos, a principal espécie causadora do defeito, devido a sua maior resistência ao sal e a valores de pH ácido. Com a fermentação butírica, ocorre um aumento do valor do pH, o que permite o crescimento de espécies proteolíticas ou putrefativas como: *C. sporogenes*, *C. perfringens* e *C. bifermentans* (Van Dender, 2006).

A multiplicação de *Clostridium* pode ocorrer tanto em queijos de baixa acidez, como Emmental, Gouda e Edam, como em “queijos duros”, como Cheddar, Grana e Parmesão. O crescimento desses microrganismos depende da particularidade do queijo como meio de cultura, do pH, do conteúdo de umidade, da concentração de sal, da presença de compostos inibidores e da temperatura de maturação. O pH e umidade também influenciam no crescimento de *Clostridium* na silagem (Bergère, 1970).

Tanaka, *et al.*, 1979, estudaram a capacidade de crescimento de *C. botulinum* e conseqüente formação de toxina em queijo fundido, com diferentes teores de umidades e presença de Citrato de Sódio ou de fosfato de sódio. Após finalização

do experimento, os autores observaram que no grupo que apresentava menor teor de umidade (51,5%) e adição de Citrato de Sódio o crescimento de *Cl botulinum* foi evidenciado após a 12^ª semanas de incubação a 30°C , entretanto não ocorreu a formação da toxina botulínica durante todo o experimento (48 semanas de incubação). Já na presença de fosfato de sódio não ocorreu crescimento microbiano nem produção da toxina durante as 48 semanas estudadas. Já grupo que apresentava teor de umidade intermediário (54%) e adição de Citrato de Sódio, produziu a toxina na 8^ª semana de incubação, enquanto que com a utilização de fosfato de sódio, não ocorreu nem o crescimento de *C. botulinum* como a produção da toxina durante as 48 semanas de análises. Já o grupo que apresentava maior teor de umidade (58%) e adição de Citrato de Sódio apresentou a produção da toxina botulínica na 4^ª. semana de incubação, enquanto que na presença de fosfato de sódio a formação da toxina ocorreu na 8^ª semana. Demonstrou-se neste estudo que queijos fundidos, são susceptíveis tanto à presença de *C. botulinum* como à formação da respectiva toxina (Tanaka et. al., 1979).

3.2.2.1. Características da espécie *C. butyricum*

O habitat do *C. butyricum* é principalmente solos férteis, plantas (tubérculos e raízes), e trato intestinal de animais. Este microrganismo está mundialmente distribuído com ampla frequência. São bastonetes que medem aproximadamente 0.8 a 1.0 x 3 a 12 µm, são móveis através da presença de flagelos peritríquios, apresentando esporo central ou subterminal. São extremamente anaeróbios, com temperatura ótima para crescimento na faixa de 37°C, podendo variar entre 18 a 42°C. Apresentam resistência térmica de 10 minutos a 80°C, produzem grande quantidade

de gás (CO₂ e H₂), ácidos butírico e acético e algumas vezes ácido propiônico e valeriânico e odor rançoso (Prevot, 1965).

3.2.2.2. Características da espécie *C. saccharobutyricum*

O *C. saccharobutyricum* apresenta como principal habitat o solo e o leite de vaca. Sua morfologia é idêntica à do *C. butyricum*, apresentando também a temperatura ótima de crescimento de 37 °C, podendo variar entre 18 a 42°C. Resistem 3 minutos à 100 °C. Produzem CO₂, H₂, butanol, acetil-metil-carbinol, ácido butírico, fórmico, acético e láctico através da fermentação de mono e dissacarídeos, amido e glicerol, entretanto não fermentam celulose (Prevot, 1965).

3.2.2.3. Características da espécie *C. tyrobutiricum*

Uma característica importante do *C. tyrobutiricum*, é que este microrganismo apresenta como um dos seus principais habitats o queijo, além da silagem e de materiais orgânicos em decomposição. Morfologicamente são bastonetes ovóides que medem aproximadamente entre 0.8 a 1.2 x 2 a 15 µm, e apresentam esporos subterminais. São estritamente anaeróbios, fermentam glicose, frutose, arabinose e lactato de cálcio. O nitrato pode ser reduzido a nitrito, produzem principalmente ácido butírico, porém não ocorre a formação de H₂S, e não produzem indol (Prevot, 1965).

3.2.2.4. Características da espécie *C. sporogenes*

O *C. sporogenes*, é um microrganismo principalmente proteolítico. Apresenta como principal habitat o solo, esterco e fezes de humanos e animais;

também são extremamente anaeróbios, possuindo temperatura ótima de crescimento entre 22 a 37°C. São altamente resistentes ao calor, podendo sobreviver de 15 minutos à 1 hora à 100 °C, sendo reconhecidos como microrganismos indicadores de esterilidade em produtos cárneos. Produzem grande quantidade de gás e odor putrefativo. A digestão do leite ocorre previamente à coagulação, com respectiva produção de gás e H₂S. Fermentam glicose, frutose, maltose, galactose, manitol, dextrina, glicerol e sorbitol. São capazes de formar nitrito através de nitrato, algumas linhagens reduzem sulfito a H₂S, produzem também NH₃, aminas voláteis (trimetil-amina), ácido acético, butírico e láctico. São patogênicos, através da formação de substâncias tóxicas em alimentos além de apendicite (Prevot, 1965).

3.2.2.5. Características da espécie *C. perfringens*

Cl. perfringens é uma espécie que produz diferentes substâncias solúveis que causam uma variedade de efeitos tóxicos tanto em vitro como em vivo, sendo assim, esta espécie é dividida em 5 grupos de acordo com produção de substâncias tóxicas letais. A temperatura ótima de crescimento para este microrganismo varia entre 37°C a 45°C, e o pH de crescimento entre 5.5 –8.0. (Sneath, 1986). Labbe & Duncan, (1974) demonstraram em seu estudo que o pH ótimo para esporulação é 7.0.

Este microrganismos é o mais associados a surtos epidemiológicos causados pela ingestão de alimentos contaminados por células viáveis deste microrganismo. O início dos sintomas geralmente surgem de 12 a 14 horas após a ingestão do alimento contaminado por um grande número de células viáveis (Hickey, *et al* 1981).

A intoxicação causada por este microrganismo está relacionada a uma enterotoxina termoresistente produzida no momento da esporulação do mesmo, geralmente quando este se encontra no intestino do paciente. Testes in vitro demonstram que a enterotoxina aparece por volta de 10 a 12 horas após a lise da célula no momento da esporulação, causando como principal sintoma a diarreia. Embora não ocorra a formação da enterotoxina no alimento, caso este apresente as condições favoráveis para a esporulação do microrganismo, o alimento pode ser contaminado pela toxina (Hickey, *et al* 1981).

O microrganismo pode perder a viabilidade caso o alimento suspeito permaneça refrigerado por longos períodos ou caso ele seja congelado antes das análises, dificultando a confirmação da presença deste microrganismo em surtos de toxinfecção alimentar. Nestes casos, a coloração de Gram do microrganismo no alimento remanescente deve ser examinada pela presença de um bastonete “grande” típico de *C. perfringens*. Alimentos relacionados a surtos geralmente contêm grande número de células.

Esporos de diferentes linhagens de *C. perfringens* variam de resistência térmica, desde esporos que sobrevivem mais de uma hora a 100°C até aqueles que são facilmente inativados por alguns minutos à mesma temperatura (Hickey, *et al* 1981).

3.2.2.6. Características da espécie *C. thermosaccharolyticum*

C. thermosaccharolyticum caracteriza-se por ser Gram positivos, seus bastonetes são longos e finos, anaeróbios estritos, produtores de etanol a partir de

celulose, e altamente consumidores de pentoses como xilose e arabinose (Baskaran et al, 1995). Seu pH ótimo de crescimento e esporulação está em torno de 5 e 5,5 (Pheil & Ordal, 1967). Requer fontes exógenas para a produção de esporos, sendo essencial a presença de pentoses e peptona como fonte de nitrogênio.

3.2.3. Microrganismos Gram negativos psicrótróficas

Dentre as bactérias Gram negativas, as psicrótróficas são aquelas capazes de crescimento nas temperaturas de refrigeração e na temperatura ambiente dos alimentos. A presença dessas bactérias no leite indica contaminação ambiental. O efeito detrimental da atividade das bactérias psicrótróficas na qualidade do leite ou dos produtos derivados, é de grande significância para a indústria de laticínios. Essa atividade é decorrente da síntese, seguida pela liberação extracelular, das enzimas peptídicas e éster hidrolases (Vargas, 1979). Entre as bactérias psicrótróficas Gram negativas o gênero *Pseudomonas* é capaz de produzir enzimas termoresistentes (proteases e lipases) em leite cru causando defeitos no Produto Final.

von Bockelmann, 1970, citado por Vargas, 1979, observou que o número de linhagens de bactérias produtoras de hidrolases peptídicas, utilizando caseína como substrato, foi maior do que aquelas produtoras de éster hidrolases, utilizando gordura da manteiga como substrato. Em decorrências disto, a caseína, no seu estado nativo em leite, pode ter a sua estabilidade térmica seriamente comprometida.

Queijo cottage e suas variedades estão sujeitos à deterioração por bactérias gram negativas, leveduras e fungos (mofo). Estes microrganismos podem crescer visivelmente na superfície e produzir enzimas e metabólitos que causam

deterioração do sabor e odor do produto. (Brocklehurst & Lund 1988).

Crescimento de *Pseudomonas fluorescens*, *P. putida* e *Enterobacter agglomerans* são a principal causa de deterioração em certas variedades de queijo cottage, principalmente aqueles que apresentam pH entre 4,9-5,2. Medidas para prevenir deterioração por essas bactérias incluem: acidificação e cloração da água utilizada para lavar a coalhada, armazenamento em baixa temperatura, formulação do produto para se obter um pH igual ou inferior a 5,0 e adição de sorbato 0,05% - 0,10% p/p. (Brocklehurst & Lund 1987).

3.2.4. Bactérias Lácticas

As bactérias ácido lácticas incluem tanto *Lactobacillus* quanto *Lactococcus* e nunca formam esporos. Esses microrganismos são denominados de bactérias lácticas em função de sua preferência em utilizar lactose como fonte de carbono, transformando a lactose em ácido láctico sendo responsáveis pela acidificação espontânea do leite. A maior parte das bactérias lácticas é destruída pelo aquecimento a 70 °C. A multiplicação de alguns destes microrganismos é acompanhada pela liberação de enzimas proteolíticas capazes de degradar a caseína. A proliferação desses microrganismos pode ser minimizada resfriando o leite rapidamente logo após a ordenha ou pasteurizando-o imediatamente. As principais fontes de contaminação são os utensílios e equipamentos utilizados durante a ordenha e o transporte, além das práticas de higiene pessoal do ordenhador (Rapacci e Van Dender, 1997).

3.2.5 Importância e Distribuição de *Listéria monocytogenes* nos alimentos e especificamente em queijos

Quando descrita pela primeira vez, *Listeria monocytogenes* foi considerada um patógeno de interesse veterinário. Posteriormente, a bactéria foi reconhecida como patogênica para o homem, e somente a partir da década de 80 foi considerada passível de ser veiculada por vários alimentos. (Casarotti, et al, 1994)

Listeria monocytogenes é um bacilo Gram-positivo, não esporulado, anaeróbico facultativo e microaeróbio e parasita intracelular facultativo, amplamente reconhecido como agente de toxi-infecção alimentar. Esta espécie é a melhor caracterizada do gênero (*L. ivanovii*, *L. seeligeri*, *L. innocua*, *L. monocytogenes*) sendo patogênica para o homem e diversos animais, enquanto a *L. ivanovii* é patogênica apenas para animais (Almeida *et al.*, 1999).

Sua ampla distribuição na natureza, a habilidade de multiplicação em temperaturas de refrigeração, a capacidade de sobrevivência durante longos períodos sob condições adversas, são algumas de suas características que revelam a grande importância de *L. monocytogenes* como um problema para as autoridades de saúde pública e para as indústrias de alimentos. (Casarotti, *et al*, 1994).

De fato, a maioria dos surtos ocasionais e epidêmicos de listeriose humana tem sido associada ao consumo de alimentos refrigerados, particularmente derivados do leite, sobremesas e vegetais. Dessa forma parece que o processamento desses alimentos exerce um efeito seletivo para o crescimento de determinados clones de *L. monocytogenes* presentes originalmente na matéria-prima, ou a contaminação dos

mesmos pode ocorrer por cepas de *L. monocytogenes* já adaptadas ao ambiente de processamento. (Almeida et al,1999). Rogga, *et al*, (2005), citam que a contaminação de queijos por este microorganismo, pode ocorrer tanto como resultado do uso de leite cru contaminado, ou como resultado de uma contaminação cruzada durante e/ou após o processamento. Pelo fato da *Listeria monocytogenes* encontrar-se amplamente distribuída na natureza, este microorganismo tem sido isolado do solo, da água, do esgoto, de plantas, fezes, animais de fazenda, aves, peixes, crustáceos e mariscos (Vieira, 2000). Existem numerosas publicações que relatam a ocorrência de *Listeria* em alimentos e ambientes, tais como em vegetal, esgotos, solo, camarão, carnes, leites e derivados, incluindo leite cru e pasteurizado e queijos. (Almeida, et al.,1999).

Em comparação aos queijos duros, os queijos cremosos apresentam menor número de barreiras para a contaminação por *L. monocytogenes*, apresentando dessa forma, maior incidência e potencial para a sobrevivência e crescimento deste microorganismo. Dessa forma, queijos cremosos têm sido implicados na maioria de surtos de listeriose, em proporção ao número de casos relatados. Alguns dos maiores surtos envolvendo queijos cremosos foram, nos Estados Unidos em 1985 implicando em 48 mortes, na Suíça em 1983 até 1987 implicando 34 mortes e na França em 1995 implicando 4 mortes. (Rogga, et al, 2005).

Loncarevic, *et al*, (1995), em seu trabalho, analisaram 333 amostras de queijos cremosos e semi-cremosos, 6% (20 amostras) apresentaram contaminação por *L. monocytogenes*, das quais a contaminação em queijos fabricados com leite cru, foi maior (42%) do que os queijos fabricados com leite pasteurizado (2%). Em sua análise, a contagem de *L. monocytogenes* variou de 1×10^2 a 1×10^5 UFC/g.

Destro *et al* (1991) analisaram 140 amostras de carne, produtos cárneos, leite e produtos leitosos derivados provenientes de supermercados da região de Campinas – SP para verificação da presença de espécies de *Listeria*. Em amostras de leite cru e de queijo “Minas frescal” (20 amostras por produto), *L. monocytogenes* foi detectada em 5% das amostras, *L. innocua* em 20% e *L. seeligeri* e *L. welshimeri* em 2,5% das amostras. Nenhuma espécie de *Listeria* foi detectada nas amostras de leite pasteurizado.

Em seu trabalho Silva *et al* (1998), analisaram 103 amostras de diferentes tipos de queijos (minas frescal, ricota, gorgonzola, roquefort, brie, camembert e cheddar) fabricados e comercializados na cidade do Rio de Janeiro, 11 amostras (10,8%) estavam contaminadas com *L. monocytogenes*, 13 (12,7%) com *L. innocua*, 6 (5,8%) com *L. grayi* e 1 (0,97%) com *L. welshimeri*, sendo *L. monocytogenes* evidenciada em amostras de queijos gorgonzola, roquefort e minas frescal.

A resistência desse microrganismo a muitos agentes antimicrobianos e preservativos como ácidos, *álcalis* (pH 5-9), sal (10%), torna difícil a sua eliminação. Muito embora o microrganismo seja sensível a temperaturas de pasteurização, ele tem sido isolado de alimentos submetidos a esse tipo de tratamento térmico. (Almeida et al.,1999)

Embora exista uma margem de risco para todos os consumidores, este patógeno é particularmente temido devido à sua forte associação com septicemia, encefalite, meningite, aborto espontâneo e morte entre neonatos, idosos e consumidores com a saúde comprometida, envolvendo paciente imunossuprimidos. Esse fato, associado ao isolamento de microrganismo em alimentos processados

“prontos para consumir” despertou enorme preocupação entre os órgãos de saúde pública dos países desenvolvidos. Outrossim, devido à natureza psicrotrófica da *L. monocytogenes*, a preocupação tornou-se ainda maior. Desta forma, o risco de listeriose aumenta na proporção direta da produção crescente de alimentos frescos e processados, prontos para consumo, e que são usualmente conservados à temperatura de refrigeração. (Almeida et al.,1999).

Revisões realizadas por vários pesquisadores afirmam que é difícil ou impossível eliminar *L. monocytogenes*, de modo contínuo do ambiente de processamento de alimentos. Como um contaminante primário de superfícies de aço inoxidável, vidro, polipropileno e borracha, apresentam diferentes respostas ao calor e sanificantes. Da mesma forma, o perfil de distribuição de *Listeria*, incluindo o hospedeiro humano, as rotas comerciais e os lares, dificultam o seu controle. (Almeida et al.,1999).

Um estudo revelou uma redução decimal máxima de 2,6, correspondendo a concentração de 99,5%, de bactérias contaminantes no retentado ocasionado pela microfiltração no processamento de requeijão. A retenção microbiana é independente do número inicial e varia de acordo com a morfologia e tamanho das bactérias. Para as patogênicas, reduções celulares de 2,3, 2,4 e 3,3 foram observadas em *Listeria*, *Staphylococcus* e *Salmonella*, respectivamente (Moreno et al, 2002^b).

Devido à severidade das infecções por *Listeria*, onde a taxa de mortalidade pode alcançar cerca de 50% e por não ser conhecida ainda a dose mínima infectiva, o Food and Drug Administration dos Estados Unidos estabeleceu a norma de “tolerância zero” para o microrganismos em alimentos prontos para o consumo. Qualquer simples

confirmação de *L. monocytogenes* nestes tipos de alimentos constitui em ação regulatória para “para a venda, destruição do lote, e possivelmente, cessar o processamento” (Almeida *et al*,1999).

3.3. Incidência de microrganismos esporulados em alimentos processados

Esporos de bactérias são extremamente resistentes à temperatura, pH, radiação UV, ação enzimática, ácidos orgânicos, e podem permanecer dormentes durante longos períodos. A sobrevivência bem sucedida de um microrganismo esporulado depende da habilidade desse sistema dormente (endósporo inativo) germinar, crescer e se multiplicar em condições favoráveis para o seu crescimento (Leuschner & Lillford, 1999). As bactérias esporuladas são um problema especial para a indústria de alimentos por não ser sempre possível aplicar calor suficiente no produto, durante o processamento, para destruir os esporos sem afetar a qualidade do mesmo. Em ambientes tropicais, onde são mais abundantes, é fundamental maior conhecimento sobre os microrganismos esporulados para então controlá-los. De acordo com a FDA, 1977, citado por Segner, 1979, esterilidade comercial é definida como “condição atingida pela aplicação de calor suficiente para deixar o alimento livre tanto de células viáveis de microrganismos patogênicos como de não patogênicos, capazes de se reproduzir no alimento durante o período de estocagem”. Entretanto, a esterilidade comercial geralmente não é atingida na prática devido à resistência dos esporos de microrganismos termofílicos (Segner, 1979).

Segundo Deák & Timár (1988), os esporos aeróbios do gênero *Bacillus* são

um importante grupo de microrganismos encontrados em alimentos, devido ao seu metabolismo versátil, forte atividade sacarolítica e proteolítica e pela alta resistência de seus esporos a agentes físicos e químicos.

Muitas linhagens de microrganismos termófilos são de interesse, em função da diferença da resistência térmica conferida pelo microrganismo em questão. (Richmond & Fields, 1966).

Alguns dos queijos cremosos processados apresentam um pH em torno de 4,6, e atividade de água (a_w) maior que 0,85. Por esse motivo, conforme estabelecido pelas “Boas Práticas de Fabricação” (GMP) para produtos processados, o requeijão cremoso pasteurizado pode ser classificado como um alimento de baixa acidez, e, portanto, requer um tratamento térmico suficiente para destruir os esporos de *Clostridium botulinum*, a não ser, que seja comprovado que o produto não seja capaz de suportar crescimento de esporos desses microrganismos (Kautter, *et al*, 1979).

Segundo Margalith *et al*, (1962), citados por Richmond e Fields, (1966), espécies que já causaram deterioração em alimentos processados, antes isentos de contaminação, são: *G. stearothermophilus*, *B. coagulans*, *B. licheniformis*. *G. stearothermophilus* é altamente termoresistente sendo o responsável pela típica deterioração denominada “Acidez Plana” (Flat Sour) em alimentos enlatados de baixa acidez como: derivados de creme, ervilhas, e feijão. *Bacillus coagulans* causa “Acidez Plana” acidúrica tolerando pH mais baixos que *G. stearothermophilus* em suco de tomate e causando coagulação em leite evaporado, já, o *Bacillus licheniformis* foi encontrado em purê de banana.

Somente linhagens de *Bacillus coagulans* e *G.stearothermophilus* são consideradas como verdadeiros causadores de “Flat Sour”. *B. subtilis*, *B. brevis* e *B. circulans* também podem causar esse tipo de deterioração, porém os esporos destes microrganismos não são tão termoresistentes quanto linhagens de *G. stearothermophilus* e *B. coagulans*, sendo destruídos durante o processamento do alimento (Richmond, & Fields., 1966).

De acordo com Segner, 1979, a deterioração microbiana de alimentos processados termicamente pode ser dividida em 5 categorias:

1. Incipiente: Esse tipo de deterioração é causada por se manter o alimento muito tempo em temperaturas favoráveis para o crescimento de microrganismos antes de serem enlatados e/ou esterilizados, ou através da utilização de ingredientes muito contaminados.
2. Sub-processamento: Neste caso, a deterioração ocorre porque o alimento não recebeu um processo de esterilização efetivo para eliminar a microflora inicial.
3. Defeito de embalagem (Vazamento): Esse tipo de deterioração ocorre após o processamento, através da passagem de organismos do ambiente para dentro da embalagem que não está mais hermética.
4. Deterioração termofílica: Bactérias esporuladas que causam deterioração em alimentos enlatados de baixa acidez podem ser

divididas em 2 grandes grupos: Mesófilos e Termófilos, em ambos os casos existem microrganismos que são aeróbios, anaeróbios facultativos, ou anaeróbios estritos, e microrganismos que produzem ou que não produzem gás durante o seu crescimento. A deterioração termofílica é causada pelo resfriamento insuficiente das embalagens após a esterilização, ou por se estocar o produto em altas temperaturas.

5. A deterioração causada por microrganismos esporulados é classificada em:

a. “Flat Sour” Termofílico: Caracterizado pelo crescimento de linhagens de *G stearothermophilus*, capazes de crescer até 65°C, mas não crescem a 37°C, produzem ácido abaixando o pH do produto sem a produção de gás.

b. “Flat Sour” Acidúrico: Caracterizado pelo crescimento de linhagens de *Bacillus coagulans*, capazes de crescer desde 37°C até 55°C, porém incapazes de crescer a 65°C, responsáveis também pela diminuição do pH do produto.

c. Mesófilos anaeróbios: Causada pelo crescimento de linhagens de *Clostridium*, que produzem gás durante o seu crescimento podendo até estourar embalagens, geralmente abaixam o pH do produto. Dentro deste grupo existem os microrganismos classificados em: Proteolíticos e Sacarolíticos. Os primeiros são

ativados com choque térmico de 80°C durante 10 minutos e o segundo grupo com choques de 60°C durante 30 minutos. (Scott, *et al*, 2001)

d. Sulfito deteriorantes: Causada por linhagens de *Desulfotomaculum nigrificans*, estes microrganismos formam colônias pretas nos alimentos e produzem um odor marcante de gás sulfídrico .

e. Termófilos Anaeróbios: Causada pelo crescimento de linhagens do gênero *Clostridium*. A espécie típica é o *C. thermosaccharolyticum*. Este microrganismo apresenta como principais características o fato de ser obrigatoriamente anaeróbio e extremamente sacarolítico, produzindo ácido e grandes quantidades de gás.

6. Tratamento térmico insuficiente: Esse tipo de deterioração envolve a presença de anaeróbios putrefativos como *Clostridium sporogenes*, entretanto, varias espécies de mesófilos aeróbios esporulados também podem estar presentes. Em casos severos de tratamento térmico insuficiente, anaeróbios butíricos como *C. butyricum* ou *C. pasteurianum* são algumas vezes encontrados. A deterioração envolvendo mesófilos aeróbios esporulados é caracterizada por linhagens de *B. subtilis*, *B. coagulans*, *B. polymyxa* e *B. macerans* (Segner, 1979).

Com relação à contaminação microbiológica, a indústria de Leite e Derivados enfrenta vários desafios, pois, em primeiro lugar, parece ser impossível evitar por completo a presença de *Bacillus cereus*, em segundo lugar, seus esporos são bastante hidrofóbicos, fixando-se nas superfícies das tubulações (encanamento) onde se multiplicam e germinam, e em terceiro lugar, a pasteurização é insuficiente para destruir estes esporos (Anderson, *et al.*, 1995).

Segundo Lake, 1984, o isolamento de mesófilos aeróbios esporulados de deteriorações em alimentos enlatados de baixa acidez tem sido interpretado tradicionalmente como sub-processamento, especialmente quando essas deteriorações são proteolíticas (putrefativas). Entretanto, tem sido confirmada a suspeita de que esses microrganismos são responsáveis por deteriorações pós-processamento de alimentos enlatados de baixa acidez, alguns envolvendo surtos botulínicos. Assim, apesar dos queijos processados serem classificados como seguros para o consumo, existe a possibilidade da presença viável da toxina botulínica em queijos para comercialização (Kautter *et al*, 1979; Tanaka, *et al*, 1979; Warburton , *et al* 1986).

3.4. Mecanismo de esporulação

Esporos são formas resistentes produzidas por bactérias G+ incluindo o gênero *Bacillus* e *Clostridium*, em resposta à condições adversas ao seu crescimento. Os esporos são comumente encontrados no solo e na água sendo a forma viva mais resistente da Terra. A Figura 3.2 mostra esquematicamente a estrutura de um esporo. Esta estrutura garante a manutenção em um estado dormente e a proteção do

compartimento celular do ambiente externo. O núcleo de um esporo, denominado “core”, contém componentes citoplasmáticos normais, desde enzimas e ribossomos até DNA, porém todos em estado inativo. O DNA presente no núcleo está complexado com pequenas proteínas ácido-solúveis (SASPs) que o protegem do calor e da radiação UV. (Moir, 2003).

Durante o processo de esporulação, ocorre o acúmulo de Ácido Dipicolínico (DPA), que não está presente nas células vegetativas; sua associação com a formação do córtex sugere, que o DPA se localiza nesta região. Esta afirmação pode ser reforçada pelo fato do DPA estar presente em exsudados formados durante a germinação do esporo. Coincidentemente, com a formação de DPA, ocorre a incorporação de cálcio. Porém não se sabe se o cálcio é requerido na reação durante a formação do DPA, ou se sua presença é fundamental para a formação do complexo total (Stumbo, 1965).

Na Figura 3.1: A seta para dentro indica a entrada de agentes germinantes que vão interagir com receptores localizados na membrana interna. A flecha para fora indica o efluxo de cátions monovalentes do núcleo induzindo a germinação do esporo.

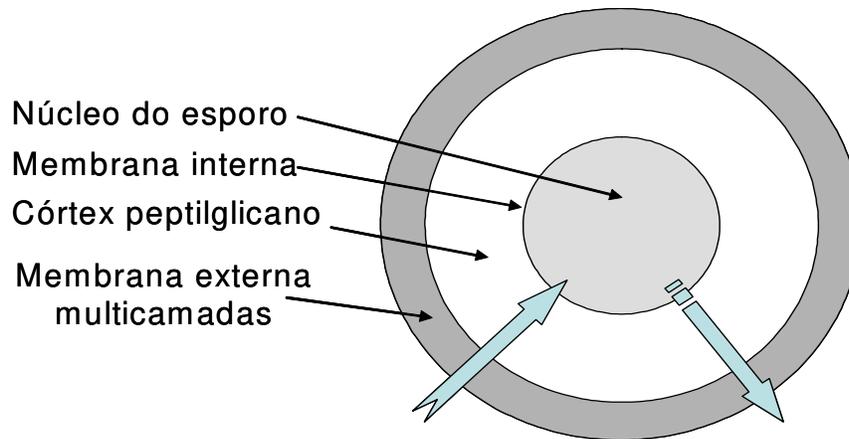


Figura 3.2: Estrutura do esporo.

3.4.1. Fatores que afetam o processo de esporulação

O processo de esporulação é influenciado pelos seguintes fatores (Stumbo, 1965):

- Temperatura: A temperatura de incubação afeta tanto a velocidade de esporulação, quanto a concentração final de esporos. Geralmente, a esporulação ocorre mais rápido quando a incubação ocorre na temperatura ótima de crescimento.
- pH: Estudos demonstram que valores de pH que não interferem no crescimento de células vegetativas, podem prevenir, por completo a formação de esporos. Deve-se ressaltar que o pH ótimo para esporulação não só varia com a espécie, como também com a linhagem. Algumas espécies requerem baixo pH (5,4-5,7) para esporulação, como o caso de *C. pasteurianum* e *B. coagulans*. Outras espécies requerem valores de pH mais altos (7,0), como no caso de *G. stearothermophilus*, *C. thermosaccharolyticum*, *C.*

sporogenes e *C. botulinum*.

- Oxigênio: O gênero *Bacillus* requer oxigênio para a produção de esporos, no caso do gênero *Clostridium*, existe pouca literatura sobre o efeito do oxigênio no processo de esporulação, sabe-se que esta pode ocorrer com uma concentração pequena de oxigênio, entretanto melhores esporulações são obtidas na ausência de oxigênio. De maneira geral os clostridiuns são mais fastidiosos para esporular que os *Bacillus*.
- Minerais: Potássio e magnésio são essenciais para uma máxima esporulação de algumas espécies, entretanto, a quantidade necessária destes íons varia entre espécies e linhagens.
- Fonte de Carbono: O efeito de diferentes fontes de carbono varia entre diferentes espécies e linhagens. Sabe-se que fontes de carbono afetam a esporulação de um modo diferente daquele para as células vegetativas. É conhecido que a esporulação ocorre quando as fontes de carbono e nitrogênio ficam reduzidas e/ou esgotadas.
- Fonte de Nitrogênio: A fonte de nitrogênio requerida por diferentes microrganismos varia desde fontes inorgânicas simples até misturas complexas de aminoácidos e peptídeos.
- Período de incubação: O período de incubação deve ser longo o suficiente para se obter esporos “maduros”, entretanto, em algumas

espécies o período de incubação não pode se estender uma vez que pode ocorrer a re germinação do esporo. Por esta razão, se faz necessária a observação microscópica diária do isolado em processo de esporulação.

3.4.2. Processo de germinação

A germinação marca a transição entre um esporo dormente e a célula vegetativa em crescimento (Allouane, *et al* 2007). A germinação ocorre em resposta a condições favoráveis do ambiente. Os compostos que ativam este processo, denominados agentes germinantes, são geralmente aminoácidos, açúcares e nucleotídeos. Em adição aos nutrientes germinantes, a esporulação também pode ser induzida por outros agentes como lisozima, sais, alta pressão, complexo Ca^+ - DPA e agentes de superfície ativos como a dodecilamina (Setlow, 2003). O agente germinante penetra no córtex e interage com receptores localizados na membrana interna, que protege o núcleo. A consequência da interação do agente germinante com o receptor inclui um rápido efluxo de cátions monovalentes (H^+ , Na^+ , K^+) do núcleo. Em seguida ocorre a liberação de ácido dipicolínico e cálcio, e o núcleo lentamente se torna mais hidratado. Enzimas “líticas”, que possuem a capacidade de hidrolisar a membrana do córtex, são ativadas, conduzindo à rehidratação do esporo. O pH interno do núcleo aumenta, reativando enzimas e sintetizando ATP. (Moir, 2003). É possível que a liberação de DPA e Cálcio no momento da germinação de um esporo estimule a germinação de outros esporos localizados na mesma região (Setlow, 2003).

3.4.3. Resistência Térmica dos Principais Contaminantes

A resistência térmica dos esporos é dependente do meio, do pH, da composição do substrato de aquecimento e da temperatura utilizada para a incubação durante o processo de esporulação. A formação de esporos mais resistentes de microrganismos obrigatoriamente anaeróbios é obtida através da incubação do microrganismo na menor temperatura de crescimento de suas células vegetativas. No caso de microrganismo do gênero *Bacillus*, esporos com maior resistência são obtidos quando incubados na temperatura mais alta na qual células vegetativas crescem.

A resistência térmica é definida por dois parâmetros importantes para o estabelecimento de um processo de esterilização. Esses parâmetros são:

- o Valor D_T , ou índice de redução decimal é definido como o tempo necessário para reduzir a população a 10% da sua população inicial a uma dada temperatura. O sub-índice T é a temperatura.
- o Valor z , conhecido como coeficiente térmico é definido, como sendo o número de graus necessários para variar D_T em 10 vezes.

3.4.4. Determinação do valor “ F_T ” requerido para o processo térmico

Geralmente os processos de esterilização requerem a destruição de muito mais do que 90 % da população de microrganismos. Então, o tempo F_T necessário para destruir uma fração γ da população de microrganismos pode ser obtido em função de D_T como:

$$F_T = \gamma D_T \quad (3.1)$$

O valor γ se conhece como número de reduções decimais requeridas, :

$$\gamma = \text{Log } N_0 \text{ (População inicial)} - \text{Log de NF (População final)}.$$

A Tabela 3.1 mostra os valores clássicos de D_T para alguns microrganismos em alimentos de baixa acidez, ácidos e altamente ácidos (Stumbo, 1965)

Tabela 3.1: Valores da resistência térmica de alguns microrganismos

Grupo bacteriológico	Resistência térmica aproximada (min)
Alimentos de baixa acidez – pH > 4,5	
Termófilos	$D_{12\ 1^\circ\text{C}}$
Grupo “flat sour” (<i>G. stercorophilus</i>).	4,0-5,0
Grupo formador de gás (<i>C. thermosaccharolyticum</i>).	3,0-4,0
Com odor de enxofre (<i>D. nigrificans</i>).	2,0-3,0
Mesófilos	$D_{12\ 1^\circ\text{C}}$
Anaeróbios putrefativos	
<i>C. Botulinum</i> (Tipos A e B).	0,10-0,20
Grupo <i>C. sporogenes</i> (Incluindo P.A. 3679).	0,10-1,5
Alimentos ácidos – pH 4,0 – 4,5	
Termófilos	$D_{12\ 1^\circ\text{C}}$
<i>B. coagulans</i> .	0.01-0.07
Mesófilos	$D_{100^\circ\text{C}}$
<i>B. polymyxa</i> e <i>B. macerans</i> .	0.01-0.05
Anaeróbios butíricos (<i>C. pasteurianum</i>).	0.01-0.05
Alimentos muito ácidos – pH < 4,0	
Mesofílicos não formadores de esporos	$D_{65^\circ\text{C}} \text{ (min)}$
<i>Lactobacillus spp.</i> , <i>Leuconostoc spp.</i> e fungos e leveduras.	0.5-1.0

De acordo com a Tabela 3.2, Cerf, *et al* (1967), citado por Bérger e Hermier, (1970) determinaram o valor D_T , em tampão fosfato ou em leite para esporos de *C. tyrobutyricum*, *C. saccharobutyricum* e *CL.butyricum*.

Tabela 3.2: Valores da resistência térmica de espécies de *Clostridium* em leite ou em tampão fosfato. Não foi indicado o valor z.

<i>Microrganismo</i>	$D_{80^{\circ}C}$ (min)
<i>C. tyrobutyricum</i>	110 a 260
<i>C. saccharobutyricum</i>	60-80
<i>C. butyricum</i>	15 a 18

3.5. Contaminação Microbiológica das Matérias-Primas

3.5.1. Leite

O leite é a principal matéria prima de requeijão. Mesmo pasteurizado ele ainda é passível de contaminação por microrganismos termoresistentes. Seu elevado conteúdo de água e nutrientes, e seu valor de pH quase neutro constituem ótimo meio para o desenvolvimento dos microrganismos normalmente encontrados na natureza (Moreno et al, 2002^b).

3.5.2. Leite cru

O leite cru, assim que é retirado do úbere de animais sadios, contém baixa

contaminação por microrganismos, apresentando geralmente contagem total $<10^3$ UFC/mL. As principais bactérias presentes no leite cru são: *Micrococcus*, *Staphylococcus*, *Streptococcus* e *Corynebacterium*. (Ritcher & Vedamuthu, 2001). Já Rapacci e Van Dender, (1997) divide as bactérias presentes no leite cru em 5 grupos:

- ✓ bactérias de ácido láctico,
- ✓ coliformes,
- ✓ bactérias de ácido butírico,
- ✓ bactérias de ácido propiônico
- ✓ bactérias putrefativas.

Após a ordenha, o leite se torna contaminado com microrganismos derivados da “pele- superfície” do animal (manejo do gado), do ambiente e/ou dos equipamentos utilizados na ordenha (Ritcher & Vedamuthu, 2001).

Van Dender, 2006, cita que a qualidade microbiológica do leite cru depende da observação de, pelo menos, seis critérios para obtenção de leite menos contaminado:

- ✓ Animais limpos e livres de parasitas e de doenças, como mastite, brucelose e tuberculose;
- ✓ Refrigeração do leite entre 2 e 4 °C;
- ✓ Baixos níveis de microrganismos saprófitos;
- ✓ Ausência de microrganismos patogênicos;
- ✓ Ausência de resíduos de antibióticos e de desinfetantes;
- ✓ Níveis reduzidos de outros contaminantes como micotoxinas, pesticidas, dentre outros.

Segundo McKinnon & Pettipher, 1983, a contaminação de leite cru por esporos de bactérias psicrotróficas é de $5,0 \times 10^9$ UFC/g. Os autores atribuem esta contagem ao tempo em que o leite permanece refrigerado antes de ser processado. Schmitt et al (2003), analisaram 120 amostras de leite oriundas de caminhões tanques, de diferentes regiões do Rio Grande do Sul e verificaram que a maioria das amostras apresentou populações de microrganismos psicrotróficos acima de 10^6 UFC/ml, denotando níveis elevados de contaminação.

Sendo assim, o leite cru é uma fonte provável da contaminação, já que o respeito a estas regras é de difícil aplicação, controle e fiscalização. Os processos térmicos são ineficazes no leite cru para inativar os esporos mesofílicos, termofílicos e termodúricos, (Kastanas *et al.*, 1995).

3.5.3. Leite Pasteurizado

A pasteurização é um tratamento térmico que causa a destruição total dos microrganismos patogênicos presentes, elimina de 90 a 99% dos microrganismos saprófitas e desnatura determinadas enzimas, sem, contudo, alterar de maneira considerável a composição do leite (Ritcher & Vedamuthu, 2001).

As bactérias termodúricas mais comumente encontradas são: *Streptococcus* (*S. thermophilus*), *Micrococcus* (*M. luteus*), *Corynebacterium*, *Lactobacillus*, *Microbacterium*, *Arthrobacter*, *Enterococcus*. A estocagem de leite pasteurizado em temperaturas de abuso de refrigeração pode favorecer o desenvolvimento das espécies psicrotróficas, principalmente de *Bacillus*, e influenciar a vida útil do produto. *B. cereus* pode ocasionar defeitos de amargor em creme e

coágulo doce. Com exceção de determinadas linhagens de *Enterococcus* ou de espécies pouco freqüentes de *Bacillus* e *Clostridium*, as bactérias termodúricas não são capazes de se desenvolver em temperaturas inferiores a 7,2 °C, não sendo, portanto, um fator importante de deterioração de produtos refrigerados. Por outro lado, em produtos refrigerados de forma inadequada, podem se desenvolver e promover defeitos de aromas e sabores indesejáveis além de alterações físicas dos produtos.

A pós-contaminação do leite pasteurizado por *Listeria monocytogenes* e *Y. enterocolitica* é o foco principal das indústrias de Laticínios, uma vez que estes microrganismos patogênicos são capazes de sobreviver à temperatura de refrigeração (Ritcher & Vedamuthu, 2001).

3.5.4. Creme

Como o creme é um produto obtido do leite e pode ser contaminado a partir das mesmas fontes descritas para o leite cru. A microbiota do creme é constituída normalmente dos seguintes grupos de microrganismos:

- Termolábeis, destruídos pela pasteurização a 72 °C / 5", como, *Pseudomonas spp* e *Coliformes*;
- Termodúricos não formadores de esporos, mas que sobrevivem à pausterização como *Enterococcus faecalis*;
- Mesófilos e Termófilos formadores de esporos resistentes ao tratamento térmico, como *Bacillus* (aeróbios e anaeróbios facultativos) e *Clostridium* (anaeróbio).

A causa mais comum de contaminação do creme é a água, que constitui fonte para *Pseudomonas* e, se a água estiver contaminada com silagem, *Salmonella* e outros microrganismos fecais podem aparecer. Elevados números de bactérias psicrotróficas no leite cru podem levar à formação de defeitos associados à produção de enzimas lipolíticas e proteolíticas termoresistentes, como o sabor amargo (*Proteus*, bolores e leveduras), sabor rançoso (*Pseudomonas fragi* e *Pseudomonas fluorescens*) (Moreno *et al*, 2002^b).

3.5.5. Manteiga

Este produto apresenta baixo teor de umidade (16 – 16.5%) e elevado teor de gordura (80%). Os microrganismos deteriorantes mais comuns são as bactérias psicrotróficas que causam rancificação, como *Aeromonas putrefaciens* que causam odor pútrido; além da presença de diferentes bolores e leveduras que causam descoloração e defeitos de sabor (Moreno, *et al*, 2002^b).

3.5.6. Queijos

Da mesma forma que o creme, a qualidade dos queijos submetidos ao processamento, está diretamente relacionada com a qualidade do leite cru utilizado para a sua fabricação. Toda massa de queijo fresco ou queijo maturado contém um número elevado de microrganismos saprófitos, bactérias esporuladas aeróbias e anaeróbias e de bolores e leveduras. O tipo e a quantidade destes microrganismos dependem do tipo e tempo de maturação do queijo, bem como das técnicas e procedimentos de fabricação. Embora os microrganismos saprófitos tenham influência no sabor e aroma, os mais importantes são os formadores de esporos, principalmente

os *Clostridium*. (Moreno, *et al* 2002^b). Espécies de bolores deteriorantes de queijos sem conservantes são *Penicillium commun* e *P. nalgiovense*. A micotoxina mais importante encontrada em queijo é a esterigmatocistina, enquanto que as de menor importância são ácido ciclopiazônico, rugulovasina A e B e ocratoxina. As micotoxinas são metabólitos secundários tóxicos que estão relacionados com diferentes efeitos carcinogênicos e de imuno-supressão. Os bolores termoresistentes sobrevivem à pasteurização devido à produção de ascósporos, esclerócios ou clamidósporos. A espécie mais comum em queijo é *Byssochlamys nivea* (Van Dender, 2006).

3.5.7. Leite em Pó e Caseinatos

Além da qualidade dos ingredientes, os fatores que influenciam a qualidade microbiológica desses produtos são: o tratamento térmico aplicado antes da desidratação e o tipo de equipamento utilizado para secagem. Se o tratamento térmico for severo, o produto apresentará uma contagem de microrganismos reduzida, como no caso daquele obtido por secagem em rolos, no entanto se o pó for obtido por atomização sempre haverá um número maior de microrganismos. No entanto, as bactérias termodúricas (*S. thermophilus*, *Alcaligenes tolerans*) e bactérias esporuladas (*Bacillus* e *Clostridium*), bem como bolores, podem estar presentes no Produto Final. Outro fator importante relaciona-se com a multiplicação microbiana anterior ao processo de secagem, que poderá permitir que a população de *S. aureus* coagulase positiva alcance níveis em que a produção de toxina possa representar riscos à saúde do consumidor (Van Dender, 2006).

3.5.8. Especiarias e Condimentos

Especiarias e condimentos apresentam problemas microbiológicos específicos, principalmente pela contaminação de esporos de bactérias esporogênicas oriundas do solo. A microbiota do sal de origem marinha, que é o mais contaminado, é composta por *Micrococcus*, *C. butyricum* e *C. sporogenes*, enquanto o sal de minas apresenta 70% de *Micrococcus*, 20% de *Corynebacterium*, 4% de *Bacillus*, além de outras bactérias e leveduras (Moreno, *et al* 2002^b).

3.6. Limites de contaminação do requeijão

3.6.1. Critérios Macroscópicos e Microscópicos

O produto não deverá conter materiais estranhos macro e ou microscópicas de qualquer natureza. (Mercosul, 1996).

3.6.2. Critérios Microbiológicos

Não há limites na legislação atual para diversos microrganismos em requeijão, alguns dos quais oferecem risco à saúde, como *Salmonella* e *Clostridium*, e outros que podem degradar o produto (Pró Teste, 2005). De acordo com as normas do Mercosul, o requeijão deverá estar enquadrado nos seguintes requisitos microbiológicos para alimentos de categoria 5 de acordo com a tabela abaixo:

Tabela 3.3. Limites microbiológicos para contaminação de requeijão.

Microrganismos	Crítérios de Aceitação	Categoria I.C.M.S.F.	Métodos de Análise recomendado
Coliformes/g (30°C)	$n^1=5$ $c^2=2$ $m^3=10$ $M^4=100$	5	FIL73 A:1985
Coliformes/g (45°C)	$n=5$ $c=2$ $m<3$ $M=10$	5	APHA 1992 Cap. 24(1)
<i>Staphylococcus</i> coag. positiva /g	$N=5$ $c=2$ $m=100$ $M=1000$	5	FIL 145: 1990

Fonte: Mercosul /GMC/RESOLUÇÃO nº 82 (1996).

A legislação da ANVISA resolução RDC nº 12 de 02/01/2001 (BRASIL, 2001) não inclui coliformes totais, porém inclui a detecção de *Listeria monocytogenes* por 25 g do produto.

¹ n= Número de unidades a serem colhidas aleatoriamente de um mesmo lote e analisadas individualmente.

² c é o número máximo aceitável de unidades de amostras com contagem entre os limites “m” e “M” (Plano de 3 classes).

³ m é o limite que, em um plano de 3 classes, separa o lote aceitável do produto ou lote com qualidade intermediária aceitável.

⁴ M é o limite que, em plano de duas classes, separa o produto aceitável do inaceitável. Em um plano de 3 classes, M separa o lote com qualidade intermediária aceitável, do lote inaceitável. Valores acima de M são inaceitáveis.

3.7. Medidas Corretivas e Medidas Preventivas

O controle de qualidade no setor de laticínios inicia-se bem antes da produção da matéria-prima nas fazendas, pois o leite de boa qualidade só é obtido a partir de animais selecionados, sadios, adequadamente manejados, bem nutridos e livres de doenças ou infecções. Na seqüência, a ordenha tem que ser realizada de maneira correta, em ambiente apropriado. O leite precisa ser resfriado imediatamente até 2 a 4°C (esta etapa pode ser determinante da qualidade do Produto Final) e transportado nestas condições até a plataforma da indústria para que possa ser beneficiado em produtos de qualidade assegurada (Vialta et al, 2002).

O leite destinado à fabricação de queijos, inclusive dos queijos processados, deve ser pasteurizado no mais breve espaço de tempo possível após a sua chegada ao laticínio. Apesar de não eliminar os esporos, a pasteurização é uma etapa de fundamental importância na fabricação de qualquer derivado do leite, pois, além de microrganismos patogênicos, o leite também contém microrganismos e outras substâncias (subprodutos de seu metabolismo e sistemas enzimáticos) capazes de afetar as qualidades organolépticas e a vida de prateleira de produtos lácteos acabados (Rapacci e Van Dender, 1997).

Outros fatores que devem ser controlados incluem a temperatura e o tempo de fusão da massa, que deve ser realizada a uma temperatura entre 85 a 90°C durante 8 a 15 minutos. Isto assegura fusão adequada e homogênea da massa, bem como, a destruição de grande parte das bactérias termoresistentes. O resfriamento deve ser rápido para evitar o crescimento dos organismos que conseguiram sobreviver ao tratamento térmico da fusão. Recomenda-se temperatura de armazenamento

inferior a 20°C para garantir a qualidade e conseqüentemente, a vida e prateleira do produto acabado (Rapacci e Van Dender, 1997).

O desenvolvimento de bactérias de ácido butírico, causadoras de estufamento, pode ser inibido através da elevação da acidez do queijo. A adição de sal também tem efeito inibidor muito forte sobre estes microrganismos. Um método eficiente consiste na combinação destes dois fatores, mantendo-se o pH da massa entre 5,6 – 5,8, utilizando ao mesmo tempo 2.5 a 3.5% de NaCl (Rapacci e Van Dender, 1997).

A principal maneira de prevenir a contaminação de *C. tyrobutyricum* em queijos, o principal responsável pelo estufamento tardio, inclui bactofugação ou microfiltração do leite, e adição de nitrato ou lisozima. (Matijasic, *et al*, 2007). A utilização de determinadas culturas lácticas também pode diminuir o crescimento de *C. tyrobutyricum* em queijos, prevenindo a fermentação butírica e conseqüente formação de gás. De acordo com Huchet *et al* (1997) dependendo da cultura láctica utilizada, ocorre maior produção de ácido láctico na forma de lactato L(+) do que na forma D(-). Em seu estudo, os autores observaram que espécies de *C. tyrobutyricum* fermentam preferencialmente, lactato na forma D(-) três vezes mais rápido do que lactato na forma (L+), sendo assim, para reduzir o risco de estufamento tardio, deve-se utilizar linhagens culturas lácticas que produzem mais lactato na forma L(+) do que na forma D(-).

Outras formas de evitar o crescimento de bactérias esporuladas e a germinação dos esporos envolvem o uso de conservadores e microbiocinas como a nisina, por exemplo. A nisina é adicionada ao leite pasteurizado e sua eficiência

depende do número inicial de esporos, do pH do meio e do binômio tempo/temperatura ao qual o produto foi submetido. A legislação brasileira permite o uso de nisina em queijos processados até a dosagem máxima de 12,5 mg/kg de queijo. Outro agente conservador bastante utilizado no controle de bactérias anaeróbias esporuladas são os sais emulsificantes à base de polifosfatos e de ortofosfatos (Rapacci e Van Dender, 1997).

Loessner, *et al* (1997) cita em seu trabalho que polifosfatos são de grande utilização na indústria de alimentos, além de serem reconhecidos como aditivos seguros. Sua utilidade para o controle do crescimento e produção de toxinas de *Cl.botulinum* em queijos cremosos tem sido estudada.

A germinação de esporos em queijos pode ser inibida pela quantidade de ácidos graxos tipo I presentes no meio e pela presença de microbiocinas produzidas por bactérias lácticas (Kautter *et all*, 1979).

Segundo Associação Pró-Teste Consumidores, (2005) a média das temperaturas de estocagem indicadas no rótulo de 23 processadores brasileiros de requeijão foi de 7,07 °C, entretanto a temperatura observada nas gôndolas dos supermercados dos mesmos 23 produtos foi de 10,22 °C. A temperatura ideal para o armazenamento dos requeijões é entre 0 e 5 °C. Portanto, o abuso na estocagem refrigerada do produto pode favorecer o crescimento de microrganismos principalmente psicrotróficos. As análises realizadas pela associação acima, nos produtos foram: presença de *Salmonella*, *S. aureus*, *Clostrídios sulfito redutor*, *Listeria*, e indicadores de má higiene, principalmente os *Coliformes fecais*. Foram realizadas também as contagens de mesófilos aeróbios totais e bolores e leveduras, no entanto

não foi apresentado resultado quantitativo das mesmas, apenas foi indicado que estas duas últimas apresentaram variações significativas. Também, não foram realizadas análises referentes a microrganismos esporulados aeróbios e anaeróbios. (Pró-Teste 2005). Desenvolvimentos recentes na área de garantia da qualidade têm enfatizado a prevenção de defeitos em primeiro lugar, por meio da efetiva identificação e eliminação de riscos, em detrimento do controle centrado nos produtos acabados, permitindo o emprego de sistemas de Qualidade Assegurada (QA), em particular a Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle (APPCC), usada na identificação de pontos e etapas do processamento nos quais microrganismos patogênicos e deteriorantes podem sobreviver, entrar e/ou proliferar no alimento. (Vialta et al, 2002).

3.8. Processo de fabricação de Requeijão

As principais etapas e processos tecnológicos utilizados na fabricação do requeijão e outros queijos fundidos e suas influência na modificação da microbiota contaminante do leite e outras matérias-primas são:

1. Clarificação: Este processo é empregado para a remoção de matérias estranhas do leite por centrifugação utilizando um equipamento similar ao de separação do creme. É uma alternativa efetiva para a filtração e é realizada entre 32,7 e 37,8 °C. A clarificação remove bactérias, leucócitos e grumos de bactérias (Moreno et al, 2002^a).
2. Bactofugação: Dentre as tecnologias de separação física empregadas para reduzir o número de microrganismos do leite, a bactofugação é uma das que tem sido efetivamente utilizada na

prática. Seu princípio consiste na remoção das bactérias e esporos por meio de diferença da densidade. O leite é separado do concentrado bacteriano ou bactofugado. A quantidade de bactofugado é de 2 a 3% do fluido total do leite e contém entre 80 a 90% das células bacterianas presentes. A bactofugação é realizada a 60°C e, embora a eficiência dependa das condições (número inicial de esporos, temperatura e características do equipamento), esse processo é capaz de reduzir de 75 a 95% dos esporos de *Clostridium*, 90% das bactérias propiônicas, 52% das bactérias mesófilas e 88% dos coliformes (Moreno et al, 2002^a). Na indústria processadora do produto estudado não era realizada a bactofugação do leite.

3. Termização: Consiste em um tratamento térmico especial que não substitui a pasteurização e que tem como finalidade reduzir a contagem microbiana total, incluindo os microrganismos psicotróficos. Antes de estocado a temperaturas abaixo de 7°C, o leite é submetido a 64-68°C durante 10-15 segundos (Moreno et al, 2002^a). Na indústria processadora do requeijão a massa é termizada em torno de 50°C com resfriamento posterior até 17°C.
4. Desnate: A separação dos glóbulos de gordura do leite é um processo normal, visto que a gordura e o leite têm densidades diferentes, de 0,92g/cm³ e 1,034g/cm³, respectivamente. Esse processo pode ser acelerado quando o leite é submetido a uma

centrifugação contínua. Junto com a gordura também são removidos bactérias e esporos (Moreno et al, 2002^a).

5. Pasteurização: É um tratamento térmico que causa a destruição total dos microrganismos patogênicos, elimina 90 a 99% dos microrganismos saprófitos e desnatura determinadas enzimas, sem, contudo alterar consideravelmente a composição, sabor e valor nutritivo do produto. A pasteurização lenta (62 a 65 °C durante 30 minutos) apresenta uma eficiência da ordem de 95%, enquanto que a rápida (72 a 75°C durante 10 a 15 segundos) ao redor de 99,5%. Apenas as bactérias vegetativas termodúricas são capazes de sobreviver à pasteurização. Neste grupo são incluídos principalmente as espécies de *Micrococcus*, *Microbacterium*, *Streptococcus*, *Coryneformes*, *Lactobacillus* termofílicos, bem como as bactérias formadoras de esporos *Bacillus* e *Clostridium*. Ocasionalmente, alguns bolores dos gêneros *Aspergillus*, *Penicillum* e *Byssochlamys* podem sobreviver (Moreno et al, 2002^a).

6. Ultrafiltração (UF): Neste processo utilizam-se membranas geralmente de 2 a 10 nm de diâmetro, possibilitando a permeação de pequenas moléculas e a retenção de macromoléculas e colóides. Conseqüentemente os microrganismos presentes são retidos e junto com os outros componentes do leite formam o retentado ou ultrafiltrado. A temperatura adequada para o processamento de UF é 48°C (Moreno et al, 2002^a).

7. Microfiltração (MF): É um processo que separa seletivamente partículas com pesos moleculares superiores a 200.000 daltons. Em geral, o que varia é o diâmetro dos poros da membrana. O diâmetro normalmente utilizado é de 1,4nm, permitindo ampla retenção de microrganismos e restrita retenção de micelas de caseína. Como os glóbulos de gordura apresentam o mesmo tamanho das bactérias, são também retidos pela MF. Normalmente, a microfiltração do leite é realizada utilizando-se temperatura na faixa de 35°C a 50°C. Um outro tipo de tratamento térmico deve ser aplicado adicionalmente ao retentado MF, preferencialmente a pasteurização ou o tratamento UAT. Dependendo do tipo da membrana MF ou UF, pode-se alcançar redução de 98,9 a 99,99% no número de esporos, bactérias, bolores e leveduras. As células danificadas também são removidas e, conseqüentemente, as suas enzimas (Moreno et al, 2002^a).
8. Obtenção da massa: A massa de requeijão pode ser obtida pela coagulação enzimática do leite desnatado pasteurizado, pela adição de coalho e de culturas lácteas acidificantes, ou pela precipitação do leite desnatado aquecido a 85°C, desaconselhando-se a utilização de leite não pasteurizado. A indústria processadora utiliza a adição de fermento lácteo após pasteurização de leite a 95°C, permitindo que ocorra a fermentação em tanque isotérmico a 28°C durante 12 horas até pH final de 4,6. Durante a obtenção da massa, os contaminantes pós pasteurização podem ser *Micrococcus*, *estafilococos* coagulase-positivos, coliformes e bactérias lácteas. Esses microrganismos são

provenientes das linhas de processamento, utensílios e tanques de fabricação, ar, água utilizada na limpeza e a partir do pessoal envolvido no processo. A massa obtida por fermentação láctica deve apresentar pH de 5,0 a 5,2, que auxilia na inibição do crescimento de microrganismos patogênicos e deteriorantes (Moreno et al, 2002^a).

9. Preparo e mistura do Concentrado Protéico: O produto em pó é misturado com Citrato de Sódio e cloreto de sódio sendo adicionado na massa branca com água. Depois são adicionados o creme aquecido, e os sais fundentes.

10. Fusão da massa: Segundo o Regulamento Técnico para fixação de Identidade e Qualidade de Leite e Produtos Lácteos (1997), o produto deverá ser submetido a aquecimento mínimo de 80°C durante 15 segundos ou qualquer outra combinação tempo/temperatura equivalente. Na prática, a mistura é aquecida a 65-70°C por 5 minutos, sob vácuo e agitação constante. A seguir a temperatura é elevada para 75 – 80°C por 3 minutos e, finalmente para 92-95°C por 2 minutos. Esse tratamento não é suficiente para destruir todas as formas vegetativas nem os esporos de *Bacillus* e *Clostridium* altamente resistentes. Por isso o resfriamento deve ser rápido para evitar o crescimento de microrganismos sobreviventes ao tratamento térmico da fusão (Moreno et al, 2002^a). Na indústria processadora o aquecimento para fusão da massa ocorre a 80°C e no máximo 94°C.

11. Tratamento Ultra Alta Temperatura (UAT): Após a fusão, o queijo

processado pode ser submetido a tratamento térmico de ultra alta temperatura a 135-145°C durante 5 a 10 segundos, ou alguma outra combinação de tempo/temperatura equivalente. Nesse caso, sua denominação será de queijo processado UAT e sua conservação pode ser feita à temperatura ambiente. Os microrganismos sobreviventes potenciais ao processo são os esporos de *B.subtilis*, *G. stearothermophillus*, e *B. sporothermodurans*. Os bolores e leveduras são muito sensíveis ao calor, somente *Byssochlamys fulva*, *B. nivea* e *Paecilomyces* podem resistir a 100°C, mas não são produtores de toxinas (Moreno et al, 2002^a). Pode ser feito por injeção direta de vapor com temperaturas na faixa de 128-137°C monitorados com sensores.

12. Envase: O requeijão deve ser embalado a quente (71°C) em copos ou potes previamente sanitizados em solução sanitizante à base de iodo para evitar o desenvolvimento posterior de bactérias esporuladas e leveduras termoresistentes. A inversão dos copos é recomendada para evitar problemas de crescimento de fungos junto à tampa. O fechamento indevido das embalagens poderá permitir a entrada de esporos de bolores e leveduras (Moreno et al, 2002^a). Na linha de produção acompanhada, o requeijão permanecia em tanque pulmão à temperatura aproximadamente de 80°C durante aproximadamente 2 horas antes do enchimento. A seladora era do tipo contínuo, porém não asséptico.

13. Resfriamento e armazenamento: Após a embalagem, o produto deve ser resfriado o mais rápido possível para uma temperatura inferior a 10°C, sendo o copo (embalagem) invertido de modo a se deslocar o espaço vazio para o fundo, evitando o desenvolvimento de bolores e leveduras na superfície do produto. Essa temperatura deve ser mantida durante toda a etapa de transporte e comercialização do produto. Qualquer tipo de variação nas condições de armazenamento e transporte e comercialização poderão ocasionar a proliferação dos microrganismos contaminantes. (Moreno et al, 2002^a).

4. METODOLOGIA

4.1. O Produto

O produto analisado foi o Requeijão Cremoso tradicional, pH 5,8, envasado em embalagens de polivinil carbonato (PVC), proveniente de uma indústria processadora brasileira. Foram analisados dois lotes diferentes, sendo o primeiro produzido no mês de Julho de 2006 (Inverno) conforme Tabela 4.1, e o segundo no mês de Março de 2007 (Verão) conforme Tabela 4.2. Além do Produto Final (Requeijão Cremoso), foram também analisados os ingredientes utilizados na sua fabricação, bem como o produto antes da fusão (Produto de Linha), mantido no tanque de homogeneização, antes da aplicação do processo térmico UHT.

As amostras de Produto Final dos lotes 1 e 2 foram transportadas e mantidas nas respectivas temperaturas de estocagem informadas pelo fornecedor (Tabela 4.1 e 4.2), até a utilização nos experimentos simulando as condições ideais comercialmente aplicadas na indústria e no comércio. Isto a fim de recuperar microrganismos que se desenvolvem na temperatura de manutenção do produto e não na de abuso.

Tabela 4.1 Caracterização das amostras de requeijão do lote 1

Amostra	Quantidade	Fabricação	Validade	T_{estocagem} (°C)
Água Ingrediente	5	NI	NI	4
Citrato de Sódio	3	1/11/2006	01/11/2010	26
Concentrado Protéico	5	27/2/2005	27/2/2007	26
Creme de leite pasteurizado	5	13/7/2006	Utilização imediata	4
Massa Petit Swiss	5	13/7/2006	Utilização imediata	8
Produto de Linha	5	13/7/2006	Utilização imediata	4
Produto final	5	13/7/2006	11/9/2006	4

NI = não informado

Tabela 4.2 Caracterização das amostras de requeijão do lote 2

Amostra	Quantidade	Fabricação	Validade	T_{estocagem} (°C)
Concentrado Protéico	5	29/07/06	27/07/08	26
Creme de leite pasteurizado	5	02/03/2007	Utilização imediata	4
Massa Petit Swiss	5	02/03/2007	Utilização imediata	8
Produto de Linha	5	02/03/2007	Utilização imediata	4
Produto final	40	02/03/2007	01/05/07	4

4.2. Análises dos ingredientes, Produto de Linha e do Produto Final

Todas as análises foram realizadas utilizando a metodologia descrita no Compendium of Methods for the Microbiological examination of Foods (Downes & Ito 2001), com exceção da detecção de *Listeria monocytogenes* onde foi utilizado o kit “LMOII MINI VIDAS” (BioMerieux, 2003).

4.2.1. Detecção de *Listeria monocytogenes*

Para detecção do microrganismo de interesse foram realizados dois enriquecimentos. Para tanto 25g da amostra foram pesadas em um saco de stomacher estéril contendo 225 mL de Caldo Fraser com concentração média de citrato de amônia e de acriflavina e ácido nalidixico (OXOID) para completa homogeneização em Stomacher (Stomacher 400 Lab system Seward). Posto isso, a mistura foi incubada a 35°C por 26 horas. Após o período de incubação, 1 mL do caldo com o crescimento foi transferido para 10 mL de Caldo Fraser (OXOID). Este por sua vez foi incubado a 35°C por 24 horas. Decorrido este período foi realizado utilizando o Kit Mini VIDAS LMOII (De acordo com a metodologia AFNOR, no. 12/9-07/02 e Nordval, no.2003 –20-5408-00009, Biomerieux, 2003).

4.2.1.1. Princípio do Kit MINI VIDAS LMOII

O Kit Mini VIDAS *L. monocytogenes* consiste em um teste imuno-enzimático que permite a detecção de antígenos de *L. monocytogenes* pelo método ELFA (Enzyme Linked Fluorescent Assay). A sensibilidade de detecção do Kit, está compreendida

entre 4×10^5 e 10^6 células por mL; por isso é necessário proceder 2 enriquecimentos. (BioMerieux, 2003)

O cone de utilização única serve tanto de fase sólida como de sistema de pipetagem para o teste. O interior do cone está revestido com anticorpos anti-*L. monocytogenes* adsorvidos na sua superfície. Os outros reagentes, tampões de lavagem, conjugado de anticorpos anti-*Listeria monocytogenes* marcados com fosfatase alcalina e o substrato (4 metil-umbeliferil-fosfato, dietanolamina e azida sódica) estavam prontos para serem usados e pré-repartidos na tira.

Todas as etapas foram realizadas automaticamente no aparelho (modelo, V12V2867). Uma alíquota do caldo de enriquecimento foi colocada na tira e submetida a uma série de ciclos de aspiração e dispersão cuja duração foi calculada para ativar a reação. Os antígenos presentes na alíquota vão se fixar aos anticorpos anti *Listeria monocytogenes* do interior do cone. As etapas de lavagem eliminam os elementos livres. Em seguida, os anticorpos conjugados marcados com fosfatase alcalina são aspirados (dispensados pelo cone) e vão fixar-se aos antígenos de *L. monocytogenes*, que já se encontram fixados aos anticorpos da parede do cone. Novas etapas de lavagem eliminam o conjugado não fixado.

Durante a etapa final de revelação, o substrato (4-metil-umbeliferil fosfato) foi aspirado e dispensado pelo cone; a enzima do conjugado catalisou a reação de hidrólise deste substrato num produto (4-metil-umbeliferona) cuja fluorescência é emitida a 450 nm.

Terminado o teste, os resultados foram analisados automaticamente pelo

sistema VIDAS, que forneceu um Valor de Fluorescência Relativa (RFV) e um relatório impresso para cada amostra. Este valor foi comparado com as referências internas (limiares) e cada resultado interpretado como positivo ou negativo.

O RFV (Valor de Fluorescência Relativa) obtido de cada amostra é interpretado pelo Kit VIDAS como:

$$\text{Valor da Fluorescência relativa} = \text{RFV amostra} / \text{RFV calibrador}$$

Tabela 4.3 Limiar e interpretação dos resultados

Valor do teste	Interpretação
<0,05	Negativo
≥ 0,05	Positivo

O resultado onde o valor é menor que o valor limite indica que a amostra não contém antígenos de *L. monocytogenes*, ou que contém, porém em concentrações abaixo do limite de detecção. O resultado onde o valor é maior que o valor limite indica que a amostras está contaminada por *L. monocytogenes* pois apresenta antígenos da mesma.

4.2.2. Quantificação de Coliformes Totais e Fecais

Para realização desta análise presuntiva, por *número mais provável* (NMP) com série de 5 tubos, 25 g da amostra foram dispensados em um saco de stomacher

estéril contendo 225 mL de água peptonada 0,1%. Após homogeneização por 2 minutos no Stomacher (Stomacher 400 Lab system Seward) cada 1 mL de cada diluição de 10^{-1} , 10^{-2} e 10^{-3} foi adicionado a 9 mL de caldo Lauryl Tryptose Broth (LST – Difco).

Os tubos de LST que apresentaram turbidez e gás dentro dos tubos de Durham foram reportados como positivos sendo a respectiva alíquota transferida para 9mL de Caldo Brillant Green Bile (BGB – Difco) e para 9 mL de Caldo E. Coli (EC – Difco) para incubação a 35°C por 48 horas. Para confirmar a presença de coliformes fecais os critérios de positividade foram os mesmos do teste presuntivo.

4.2.3. Quantificação de *Staphylococcus aureus* e verificação da presença da enzima coagulase e Dnase

Para esta contagem foram pesados 10 g da amostra em um frasco estéril contendo 90 mL de água destilada estéril. Depois de homogeneizado, foram realizadas diluições seriadas até 10^{-2} . Para cada diluição 1mL foi igualmente distribuído na superfície de um conjunto de 3 placas (correspondendo a 0,3ml, 0,3ml 0,4 ml em cada placa) contendo o meio BP - Baird Parker (Oxoid) estéril, mediante utilização de espátula de Drigalsky. As placas foram incubadas invertidas a 35 °C por 48 horas.

Para a realização da contagem, foram somadas as colônias típicas presentes nas 3 placas de cada diluição, e multiplicou-se o resultado final pelo fator de diluição, para reportar o numero de UFC em 1g de amostra analisada.

As colônias típicas de *S. aureus*, em meio BP se apresentam pretas, circulares, brilhantes, convexas, 2-3 mm de diâmetro quando localizadas na superfície do meio,

rodeadas por uma zona clara resultado da ação da lecitinase (lecitinase positiva) no meio opaco.

4.2.3.1. Verificação da presença da enzima coagulase

Para verificar a presença da enzima coagulase, a colônia obtida em BP foi adicionada a 0,2 mL de Caldo Brain Heart Infusion estéril (BHI – Difco), sendo o tubo incubado a 35°C por 24 horas. A isto foi adicionado 0,5 mL do reagente Coagulase Plasma EDTA e a mistura homogeneizada e incubada a 35°C por 6 horas. A formação do coágulo foi observada a cada hora.

- Interpretação dos resultados
- – = Sem coágulo,
- +1 = Pequenos coágulos no fundo,
- +2 = Coagulo maior na superfície,
- +3 = Coagulo ao longo do tubo,
- +4 = Coagulação total.

O resultado só é considerado positivo quando apresentarem conceito +3 e/ou +4.

4.2.3.2. Verificação da presença da enzima Dnase

Numa lâmina contendo o meio Agar DNA - azul de toluidina uma gota da cultura sem choque térmico, com 24 horas crescimento em Caldo BHI, foi adicionada ao primeiro orifício. No segundo foi dispensada uma gota da mesma cultura após receber choque térmico em ebulição por 15 minutos. A lâmina foi colocada no interior de uma

placa de Petri, contendo papel de filtro umedecido, e incubada a 37°C por 4 horas.

O aparecimento de halo róseo ao redor do orifício que continha a gota do inoculo após o choque térmico, confirma a presença da enzima Dnase, uma vez que esta enzima é termoresistente ao choque aplicado.

4.2.4. Quantificação de *Clostridium perfringens*

Para a contagem de *Clostridium perfringens*, 10 g da amostra foram adicionados a 90 mL de água peptonada 0,1 % estéril. Para a realização do choque térmico foi transferido 5 mL da amostra homogeneizada para um tubo de rosca 16x150 mm. Este foi levado ao banho de água (Tecnal TE 057) ajustado a 75 °C. Após o choque de ativação, 20 minutos, as diluições seriadas de até 10⁻³ foram inoculadas em superfície e em duplicata em placas contendo 20 mL do meio Sahidi – Ferguson – Perfringens (SFP - Oxoid) com gema de ovo, kanamicina e polimixina. Após absorção do inóculo o meio recebeu 10mL de sobre camada do mesmo meio sem gema de ovo e as placas, assim tratadas, foram incubadas em anaerobiose a 35 °C por 48 horas.

Realizou-se a contagem das colônias típicas presentes na placa em duplicata, pelo fato de realizar inoculação em superfície, multiplicou-se o resultado por 10, após tirar a média, considerou-se o fator de diluição sendo o resultado interpretado por 1 g do produto. Colônias típicas são pretas, com halo opaco causado pela produção de lecitinase, e com 1-2 mm de diâmetro.

4.2.4.1. Teste de confirmação de *C. perfringens*

As colônias que apresentaram características típicas foram transferidas para Caldo Tioglicolato e incubadas a 35 °C durante 12 horas. Em seguida foi realizado coloração de Gram para verificar a presença de bastonetes grandes Gram positivos, típicos de *C. perfringens*. A partir da cultura obtida no caldo Tioglicolato procedeu-se esgotamento em placas contendo meio seletivo SFP (OXOID) incubadas em anaerobiose a 35° C durante 24 horas, a fim de se obter colônias isoladas. Com estas colônias foram realizados os seguintes testes bioquímicos para confirmação do microrganismo em questão:

- Teste de motilidade e redução do nitrato, onde a cultura foi inoculada por meio de punção em tubo contendo meio motilidade nitrato, e incubado a 35° C durante 24 horas. Colônias típicas não apresentam motilidade e são capazes de reduzir nitrato a nitrito, visível através da mudança da coloração do meio claro (beje) para laranja ou vermelho.
- Teste de lactose gelatina, onde a cultura foi inoculada por meio de punção em tubo contendo lactose gelatina e mantido a 35° C de 24 a 48 horas. Colônias típicas são capazes de fermentar a lactose com mudança da cor do meio de vermelho para amarelo e hidrolizar a gelatina (Labbe, R.G., 2001).

4.2.5. Quantificação de Mesófilos Aeróbios Esporulados

Após adicionar 25 g do produto em 225 mL de água peptonada 0,1 % estéril,

presente em um saco de Stomacher estéril, a amostra foi homogeneizada por 2 minutos no Stomacher (Stomacher 400 Lab system Seward). Posteriormente foi distribuída em 3 erlenmeyers contendo 100 mL de meio TGE (meio formulado) etéril da seguinte forma:

1. 10 mL no primeiro erlenmeyer
2. 1 mL no segundo erlenmeyer
3. 0,1 mL no terceiro erlenmeyer

As alíquotas receberam choque térmico sub letal de ativação, a 80 °C por 30 minutos, em banho de água (Tecnal TE 057). Após este tempo os erlenmeyers foram então resfriados em banho de gelo até atingir temperatura ambiente. O conteúdo de cada erlenmeyer foi distribuído igualmente em cada uma de 5 placas de Petri estéreis. As placas assim tratadas foram incubadas invertidas à 35 °C por 48 horas.

Os resultados foram expressos considerando que o primeiro erlenmeyer, contendo 10 ml da amostra homogeneizada representou a contagem de esporos mesófilos aeróbios em 1g da amostra analisada. Analogamente, 1 ml e 0,1 ml da amostra representou a contagem de esporos mesófilos aeróbios em 0,1g e 0,01g da amostra analisada. Portanto, o resultado da contagem das placas para o inoculo de 1 ml e 0,1 ml foi multiplicado respectivamente por 10 e 100, para expressar a concentração de esporos por 1g de produto.

4.2.6. Quantificação de Termófilos Aeróbios Esporulados

Cada 20 g da amostra de interesse foi dispensado em erlenmeyer de 250 mL estéril, adicionando água destilada estéril até completar 100 mL. Em seguida, foi procedido o choque térmico a temperatura ebulição por 5 minutos. O frasco foi resfriado

em banho de gelo até atingir temperatura ambiente. Na seqüência foi inoculado 2 mL em cada uma das 5 placas de Petri estéreis, para plaqueamento em profundidade, adicionado 20 mL de meio DTA (Dextrose Triptona Agar - Difco) por placa. As respectivas placas foram incubadas invertidas a 55°C por 48 horas.

Para interpretar os resultados de “Flat Sour” termofílicos o crescimento das placas se apresenta com colônias típicas de *G. stearothermophilus*, cabeça de alfinete, escuras, rodeadas por halo amarelo como conseqüência da acidificação do meio, a soma de apenas estas colônias representa o resultado de esporulados causadores de “Flat Sour” termofílico, conhecidos também como acidez plana devido a formação de ácido láctico sem produção de gás. Para interpretar os resultados de “Flat Sour” acidúricos as colônias típicas de *B. coagulans* se apresentam grandes e brancas, também rodeadas por halo amarelo, a soma de apenas estas colônias representam o resultado de esporulados causadores de “Flat Sour” acidúrico, conhecidos também como acidez plana. A somatória de todas as colônias presentes nas placas representa a contagem de termófilos totais.

A soma das contagens das colônias típicas das 5 placas, representou a concentração de esporos em 2g da amostra analisada. Sendo assim, para reportar o resultado por 10 g da amostra, multiplicou-se a somatória das colônias por 5.

4.2.7. Quantificação de Mesófilos Anaeróbios Esporulados

Para esta análise foi considerado o procedimento utilizado para leite em pó. Assim sendo, a um erlenmeyer de 250 mL foram dispensados 11 g da amostra e 99 mL de água destilada estéril. Após homogeneização do conteúdo, 20 mL foram igualmente

distribuídos em 6 tubos 25 x 200 mm contendo 18 mL de caldo PE-2 acrescidos de 16 ervilhas e previamente exaustados por 10 minutos. Os tubos foram então submetidos ao choque térmico de 100°C por 20 minutos, em banho termostático de óleo (Polystat, Poly Science, IL, USA, $\pm 0,1^{\circ}$ C de precisão). Após este tempo, os tubos foram colocados em banho de gelo até atingirem temperatura ambiente. Para gerar completa anaerobiose cada tubo foi selado com 10 mL de vaspar e incubados a 35 °C por 3 dias.

O resultado foi considerado positivo quando os tubos apresentaram alta produção de gás, digestão das ervilhas e acidificação do meio. O resultados é expressado em % de tubos positivos de 6 inoculados.

4.2.8. Quantificação de Termófilos Anaeróbios Esporulados

Para esta análise foi pesado 20 g da amostra em um erlenmeyer de 250 mL estéril, e o volume completado até 100 mL com água destilada estéril. Após homogeneização a amostra foi submetida ao choque térmico sob ebulição por 5 minutos. O frasco foi resfriado em banho de gelo até atingir temperatura ambiente. Em seguida, 20 mL da amostra foi igualmente distribuída em 6 tubos 25 x 200mm contendo 18 mL de caldo PE-2 acrescidos de 16 ervilhas e previamente exaustados. Cada tubo foi selado com 10 mL de Vaspar e incubado a 55 °C de 3-7 dias.

Para expressar o resultado, as mesmas considerações utilizadas para a contagem de Mesófilos Anaeróbios Esporulados foram adotadas.

4.3. Acompanhamento da vida de prateleira do requeijão

Para a realização do acompanhamento microbiológico de vida de prateleira do produto, foram realizadas análises de 5 amostras semanalmente durante 50 dias de vida de prateleira, totalizando 40 amostras de Produto Final referente ao lote 2.

Em todas as amostras o pH foi monitorado como indicativo de contaminação através da utilização do potenciômetro digital Digimed-Tecnal (Modelo DMPH-2)

A condição de estocagem do Requeijão Cremoso durante o estudo foi de acordo com a temperatura indicada no rótulo como ótima para a sua conservação, sendo assim as amostras foram mantidas em B.O.D. (Marconi – MA 415/S) ajustada a 4 °C durante o tempo de análise.

As seguintes análises foram realizadas semanalmente de acordo com a metodologia descrita no Compendium, APHA (2001), com exceção da análise de detecção de *Listeria monocytogenes* onde foi usado o Kit MINI VIDAS LMOII:

- Mesófilos Aeróbios Esporulados,
- Mesofilos Anaeróbios Esporulados contemplando os esporulados proteolíticos (choque 80°C/10min) e não proteolíticos (choque 60°C/30min) contabilizados individualmente e a soma de ambos como mesófilos anaeróbios totais,
- Termófilos Aeróbios causadores de Acidez Plana (“Flat Sour”)
- Termófilos Anaeróbios Esporulados,
- Contagem de Coliformes Totais e Fecais,
- Contagem de *C. perfringens*,

- Contagem de *Staphylococcus aureus* coagulase positiva,
- Detecção de *Listeria monocytogenes* usando a metodologia AFNOR (No. Bio – 12/9-07/02) e NORDVAL (No. 2003 – 20 – 5408 – 00009), através da utilização do Kit MINIVIDAS (Biomérieux, 2003).

4.4. Microrganismos esporulados isolados durante a vida de prateleira.

Foram isoladas, no máximo, 3 colônias de morfologias diferentes, de cada análise de microrganismos esporulados. Para o isolamento dos microrganismos aeróbios estritos e facultativos realizou-se a inoculação da colônia em placas contendo meio Nutriente Agar (Dífcó), estas foram incubadas durante 24 horas a 35 °C para os microrganismos mesófilos e 55 °C para os microrganismos termófilos. Após o período de incubação foram realizadas análises morfológicas das colônias e coloração de Gram, com a finalidade de confirmar a pureza das culturas.

Para o isolamento dos microrganismos anaeróbios estritos e facultativos realizou-se a inoculação de uma alçada do Caldo PE-2 para placas contendo meio Reinforced Clostridial Agar (RCA-Oxoid). As placas foram então rapidamente introduzidas em jarras de anaerobiose e incubadas durante 72 horas à 35 °C para os mesófilos e 55 °C para os termófilos. Para confirmar a pureza do isolado, foram analisados as características morfológicas e coloração de Gram das colônias.

4.5. Caracterização em nível de gênero

Para identificação dos microrganismos referentes ao Gênero *Bacillus* realizou-se análise morfológica da colônia, análise microscópica (Coloração de Gram e de Esporos) e teste de catalase para os isolados puros com crescimento de 24 horas em placas de Nutriente Agar (Difco) mantidas a 35°C para os mesófilos e a 55°C para os termófilos (APHA, 2001).

Para caracterização dos microrganismos anaeróbios, as mesmas análises descritas acima foram realizadas, porém antes de realizar teste de catalase, o isolado puro proveniente das placas de RCA eram inoculados em placas contendo Agar Gema de Ovo -AGO (Meio Formulado), para prevenir um resultado falso positivo, uma vez que a composição do meio RCA contém componentes que podem interferir na reação de catalase. As placas contendo AGO inoculadas foram incubadas em Jarras de anaerobiose durante 48 horas para a realização das análises. Holdeman, *et al* (1977). Os anaeróbios facultativos Gran positivos, catalase positivos e produtores de esporos foram classificados como *Bacillus*.

4.6. Manutenção dos Isolados

A manutenção das culturas foi realizada em Agar Nutriente (OXOID) a 4°C para os microrganismos do gênero *Bacillus*, e em Caldo de Carne Cozida (OXOID) ou Caldo Tioglicolato (DIFCO) a 4°C para os microrganismos anaeróbios; até uso posterior.

4.7. Esporulação dos isolados provenientes do acompanhamento de vida de prateleira lote 2

Considerando o alto número de microrganismos isolados durante a vida de prateleira do Requeijão Cremoso, optou-se por isolar 3 colônias de microrganismos diferenciados por análise de cada amostra do 1º dia e do 22º dia de análise, uma vez que estas datas apresentaram maior número e variedade de isolados.

4.7.1. Metodologia para produção e coleta dos esporos do gênero *Bacillus*

Para esporulação dos isolados aeróbios estritos do gênero *Bacillus* a metodologia utilizada foi conforme descrita por Pflug (1991) usada para a esporulação de *B. subtilis*.

Para a esporulação dos isolados referentes ao gênero *Bacillus*, foi necessária a realização de uma pré-esporulação da cultura em meio Triptona Glucose Extrato de Carne Agar (TGE-meio formulado), uma vez que este foi o meio utilizado para o isolamento do microrganismo do produto. A cultura inoculada no meio TGE deveria conter 24 horas de crescimento em meio Nutriente Agar (Oxoid).

Para crescimento os tubos foram incubados a 35°C para mesófilos e 55°C para termófilos, durante 48 horas. Após a incubação, foi realizada coloração de Gram para confirmar a ausência de contaminação. Este procedimento é denominado pré-esporulação. Para a retirada do crescimento, foi adicionado 1 ml de água destilada estéril no tubo e o crescimento foi então raspado com o auxílio de uma bagueta estéril.

Transferiu-se 0,4 ml do inóculo para garrafas de vidro de 220 ml contendo 60 ml de Nutriente Agar, sem adição de sulfato de manganês, utilizado como meio de esporulação. O excesso de inóculo foi descartado, e as garrafas foram incubadas à temperatura de crescimento de 35 °C para mesófilos e 55 °C para termófilos. À partir do segundo dia, o processo de esporulação foi acompanhado diariamente, através da realização de coloração de esporos. Obtendo-se de 80 a 90% do campo esporulado, foi realizada a lavagem das garrafas.

Para coleta de esporos adicionou-se de 6 ml de água destilada estéril por garrafa e o crescimento foi raspado com bagueta estéril. A suspensão foi filtrada em funil contendo 2 camadas de gaze estéril e coletada em um erlenmeyer estéril.

Para a centrifugação, foi padronizada a quantidade da suspensão nos tubos pareados da centrífuga (aproximadamente 40 g), sendo cada suspensão centrifugada 3 vezes à 10.000 rpm à 5 °C durante 15 minutos. Após cada centrifugação o sobrenadante foi descartado e o centrifugado resuspendido em água estéril para próxima centrifugação. Depois de pronta a suspensão foi estocada à 4 °C em tubos de rosca 25 x 200 mm contendo pérolas de vidro (Stumbo 1965).

4.7.2. Metodologia para produção e coleta dos esporos de anaeróbios estritos e facultativos.

4.7.2.1. Teste para diferenciação da capacidade proteolítica e não proteolítica dos isolados anaeróbios

À partir do crescimento em Caldo PE-2, isolou-se o microrganismo em placas contendo meio RCA (OXOID), as quais foram incubadas em anaerobiose durante 48 horas a 35°C para o mesófilos e 55°C para os termófilos. O crescimento foi então transferido, tanto para tubos contendo Caldo Tioglicolato quanto para tubos contendo Caldo de carne cozida (Oxoid) estéreis, adicionando-se rapidamente vaspar. Os mesmos foram incubados durante 72 horas na temperatura ótima de crescimento. Para verificação de resultado positivo, observou-se a produção de gás e turbidez, classificando como microrganismos em proteolíticos os que cresceram no caldo Cooked meat e em não proteolíticos os que cresceram em Caldo Tioglicolato. (Holdeman, *et al* 1997)

4.7.2.2. Metodologia utilizada para esporulação das espécies não proteolíticas

Para os *Clostridium* não proteolíticos a metodologia utilizada foi conforme Duncan & Strong (1968) D&S, através da utilização do método de transferências sucessivas. Para tanto, primeiramente, inoculou-se 1 mL do isolado em questão em 10 mL de Caldo Tioglicolato. Após 16 horas de incubação à 35 °C para mesófilos e 55 °C para termofilos, foi transferido 1 mL do caldo com crescimento para cada um de 3

tubos contendo 9 mL de Caldo Tioglicolato (Difco) estéril previamente exaustados, após 4 horas o mesmo procedimento foi repetido. Passadas 4 horas de incubação foi transferido todo o conteúdo dos tubos, para 3 frascos de rosca contendo 100 mL de meio Duncan & Strong estéril (D&S-meio formulado). Os frascos foram incubados por mais 4 horas. Passado o tempo, transferiu-se 250 mL do caldo contendo o crescimento em um erlenmeyer de 3 litros contendo 2,5 L de meio D&S, que por sua vez, foi incubado durante 40 horas. Durante todo o procedimento, a condição de anaerobiose foi gerada através da adição de 0,05 g por litro de Tioglicolato de Sódio nos meios utilizados, não sendo necessário a utilização de Vaspar. Nos erlenmeyers contendo 2,5 L de D&S foram introduzidos 3 tubos 25 x 200 mm contendo aproximadamente 40 ml de água destilada estéril exaustada, com a finalidade de reter os gases gerados funcionando como selo de água. Passadas as 40 horas de incubação, todo o conteúdo do erlenmeyer foi centrifugado duas vezes à 11000 rpm, à 4 °C durante 10 minutos. Após cada centrifugação o sobrenadante foi descartado e o centrifugado resuspendido em água estéril para próxima centrifugação. Depois de pronta, a suspensão foi estocada à 4 °C em tubos de rosca 25 x 200 mm contendo pérolas de vidro.

4.7.2.3. Metodologia utilizada para esporulação das espécies proteolíticas

Para os *Clostridium* proteolíticos a metodologia utilizada foi conforme a descrita por Reed *et al* (1951), através da utilização do método de transferências sucessivas. Para tanto, foi inoculado 1 mL da cultura em questão em um tubo de rosca contendo 10 mL de Caldo de Fígado (CF, DIFCO) previamente exaustado, rapidamente

adicionou-se vaspar para gerar anaerobiose. O tubo foi então incubado à 32°C durante 24 horas. Passado o tempo de incubação, foi transferido 2 mL do tubo contendo o crescimento para cada 3 tubos de rosca contendo 10 mL de CF exaustado e adicionado de 1 prego não galvanizado. Estes foram então incubados à 32°C durante 24 horas. Passado o tempo de incubação, o mesmo procedimento foi realizado, repetindo-se também as condições de incubação. Passadas 24 horas todo o conteúdo do tubo foi transferido para 3 erlenmeyer de 250 mL contendo 50 mL de CF adicionado de 5 pregos não galvanizados. Após 24 horas de incubação à 32 °C, o conteúdo dos 3 erlenmeyers foi transferido para um erlenmeyer de 3 Litros contendo 2 Litros de CF e 12 pregos não galvanizados. Este foi incubado à 32°C durante 1 semana. Todos os tubos e erlenmeyers foram estratificados com Vaspar estéril. Para a centrifugação foi padronizado a quantidade da suspensão nos tubos pareados da centrifuga (aproximadamente 200 g), sendo cada suspensão centrifugada 2 vezes à 10.000 rpm à 5 °C durante 10 minutos. Após cada centrifugação o sobrenadante foi descartado e o centrifugado resuspendido em água estéril para próxima centrifugação. Ressuspendeu-se o precipitado em água destilada estéril e o conteúdo foi filtrado em funil contendo 2 camadas de gaze estéril e coletada em um erlenmeyer estéril. Logo após realizou-se a última centrifugação. Depois de pronta a suspensão foi estocada à 4 °C em tubos de rosca 25 x 200 mm contendo pérolas de vidro.

4.8. Padronização e contagem das suspensões de esporos produzidas

4.8.1. Contagem das suspensões *Bacillus* aeróbios estritos

Para a quantificação das suspensões aeróbias, primeiramente foi realizada a ativação do microrganismo. Esta ativação foi feita através de choques térmicos com os binômios (tempo/temperatura) aplicado de acordo com a metodologia seguida para ativação de esporos em leite desidratado (Sott, *et al* 2001; Evancho, *et al* 2001)

Assim, transferiu-se 0,5 mL da suspensão para um tubo de rosca 13 x 100 mm contendo 4,5 mL de água destilada estéril. Para a ativação das culturas mesofílicas o tubo de rosca foi levado ao banho de água (Tecnal TE 057) ajustado à 80 °C durante 30 minutos mais o tempo de atraso térmico (descrito na seção 4.8.3). No caso da ativação das culturas termofílicas o tubo 13 x 100 mm contendo 0,5 mL da suspensão adicionado de 4,5 mL de água destilada estéril foi aquecido com água em ebulição durante 5 minutos mais o tempo de atraso térmico. Após o choque térmico, os tubos foram esfriados em banho de gelo até atingirem temperatura ambiente. Logo após, foram realizadas diluições em série em água destilada estéril, sendo o plaqueamento realizado em profundidade utilizando o meio Tryptic Soy Agar (Oxoid). As placas foram então incubadas durante 48 horas à 35 °C para mesófilos e a 55 °C para termófilos.

4.8.2. Contagem das suspensões de *Bacillus* anaeróbios facultativos e *Clostridium*

Para a quantificação das suspensões anaeróbias de microrganismos esporulados, primeiramente foi realizada a ativação do microrganismo através do choque térmico, sendo este à 100 °C durante 5 minutos para termófilos e à 100 °C durante 20 minutos para os mesófilos, sendo este binômio (tempo/temperatura) aplicado de acordo com o metodologia seguida para ativação de esporos em de leite desidratado (Sott, *et al* 2001; Evancho, *et al* 2001). Após o choque de ativação, os tubos foram rapidamente esfriados em banho de gelo. O mesmo procedimento aplicado para a ativação térmica das suspensões de aeróbios (seção 4.8.1) foi realizado para a ativação das suspensões de anaeróbios, adicionando-se também o atraso térmico ao tempo de choque. A metodologia utilizada para a contagem foi a do número mais provável (NMP), utilizando série de 3 tubos, pela inoculação em tubos contendo 9 mL de Caldo PE-2 estéril formulado previamente exaustados adicionado de 16 ervilhas. Todos os tubos foram estratificados com vaspar e incubados de 3 a 7 dias.

4.8.3. Determinação do tempo de atraso térmico

O tempo de atraso térmico representa o tempo necessário para o ponto frio do líquido no tubo atingir a temperatura desejada, para tanto, utilizou-se tubos de ensaio de 13 x 100mm preenchidos com 5 mL de água destilada estéril para choque à 95°C/5 minutos. Também foram usados tubos TDT com dimensões de ID = 0,6mm e OD = 0,8 mm para os choques acima de 100°C, contendo 2 mL de água destilada estéril, simulando o mesmo volume presente nos tubos contendo a suspensão. Para as

medidas dos tempos de atraso térmico, foram usados termopares flexíveis Ômega tipo T, AWG 36 TT-T36, com a junta de medida localizada na parte do tubo correspondente à 1/3 do volume total e acoplados à uma unidade registradora de dados de temperatura portátil Omega, modelo CL 526 (Connecticut, USA). Os tubos montados foram colocados num banho termostático ajustado à temperatura de tratamento e um cronômetro foi acionado ao mesmo tempo. Quando foi atingida a temperatura programada, o tempo marcado pelo cronômetro foi registrado (tempo de subida ou lag) e este valor foi acrescido ao tempo de choque térmico aplicado.

4.9. Choques térmicos progressivos no produto

4.9.1. Choques progressivos aplicados aos microrganismos aeróbios

Foram realizados choques progressivos em banho de óleo, seguido de resfriamento em banho de gelo, para a eliminação dos microrganismos mais sensíveis ao calor e isolamento dos microrganismos mais termoresistentes.

Considerando que o menor choque aplicado para o isolamento de microrganismos esporulados foi de 80 °C durante 30 minutos, a temperatura do choque térmico inicial aplicada foi de 95 °C durante 5 minutos. Os choques térmicos subsequentes para esporulados aeróbios foram de 110 °C/5', 120 °C/1', 121 °C/20' e 130 °C/3'. Estas temperaturas foram escolhidas de acordo com a sobrevivência dos microrganismos ao choque (Baglioni, 1998).

Para a realização dos choques progressivos, as suspensões foram ajustadas

nos tubos TDT a 10^4 esporos/ml. Isto foi necessário para padronizar as suspensões na mesma concentração de esporos. Após aplicar os choques térmicos, os tubos TDT foram transferidos para um banho de gelo até atingirem a temperatura ambiente. Estes foram abertos assepticamente com o auxílio de vial e o conteúdo total do tubo, 2 mL, foi transferido para um tubo de rosca 13 x 100 mm contendo 2 mL de caldo nutriente sendo incubados à 35 °C para mesófilos e a 55 °C para termófilos durante 48 horas. Considerou-se resultado positivo os tubos que apresentaram turbidez após o tempo de incubação.

4.9.2. Choques progressivos aplicados aos microrganismos anaeróbios estritos e anaeróbios facultativos

Foram aplicados os choques térmicos a 130°C/1', 133°C/3', 136°C/3,' e 140°C/1'. Para isto, transferiu-se 0,1 mL da suspensão contendo 10^4 esporos/mL para os tubos TDT contendo 0,9 mL de água destilada estéril, padronizando dessa forma a concentração de 10^3 esp./mL no tubos. Após o choque, os tubos foram resfriados em banho de gelo até atingirem a temperatura ambiente. Estes foram abertos assepticamente com o auxílio de vial e 1 mL foi transferido para tubos de rosca 16 x 150 mm contendo 9 mL de caldo PE-2, previamente exaustados e acrescidos de ervilha. Logo após adicionou-se vaspar e os tubos foram incubados à 35 °C para os microrganismos mesófilos e à 55 °C para os microrganismos termófilos. A observação de produção de gás e turbidez foi considerada como resultado positivo de sobrevivência.

4.10 Caracterização dos isolados sobreviventes ao choque térmico de 140°C/1´

4.10.1 Interpretação dos resultados e microscópica dos isolados sobreviventes no meio PE-2:

À partir dos tubos que apresentaram crescimento a em meio PE-2 após 1 semana de incubação 35°C para os mesófilos e 55°C para os termófilos, realizou-se análise visual dos tubos, seguindo os seguintes critérios:

- ✓ Produção de gás,
- ✓ Acidificação do meio,
- ✓ Digestão da ervilha,
- ✓ Turbidez,
- ✓ Alteração da consistência do meio
- ✓ Mudança de cor

A análise microscópica mediante coloração de Gram de cada um dos isolados foi realizada com finalidade de caracterizar tanto a morfologia das células vegetativas e dos esporos com relação a:

- ✓ Célula vegetativa: forma, tamanho, arranjo,
- ✓ Esporo: forma (cilíndrico, esférico), posição, intumescimento.

4.10.2 Teste de inoculação dos isolados sobreviventes ao choque 140°C/1' em meio Litmus Milk

Este teste foi realizado para observar o crescimento dos microrganismos em meio Litmus milk, simulando o que aconteceria no produto pela ação deteriorante dos isolados sobreviventes.

Sendo assim, foi inoculado cada um dos isolados provenientes do meio PE-2 em tubos contendo meio Litmus milk (meio formulado) previamente exaustados, para produzir anaerobiose adicionou-se rapidamente Vaspar. Após 1 semana de incubação a 35°C para os mesófilos e 55°C para os termófilos, realizou-se análise visual dos tubos e análise microscópica de cada isolado. A avaliação dos tubos com crescimento seguiram os seguintes critérios:

- ✓ Produção de gás,
- ✓ Acidificação do meio,
- ✓ Alcalinização do meio,
- ✓ Hidrólise da caseína com conseqüente liberação do soro,
- ✓ Fermentação tormentosa da lactose,
- ✓ Redução do corante de Litmus,
- ✓ Coagulação da caseína.

Interpretação dos resultados:

Produção de ácido: Os organismos que fermentam a lactose produzem ácido da mesma. O ácido torna o indicador de litmus de lavanda para rosa. Esta cor pode ser

mais facilmente verificada quando comparada a um tubo controle não inoculado.

Reação alcalina: A quebra de materiais nitrogenados no leite provoca a liberação de amônia, elevando o pH do meio e causando a viragem do indicador de litmus de lavanda para azul.

Redução: Organismos que liberam agentes redutores como resultado de seu metabolismo podem reduzir o litmus, transformando-o de colorido para a forma incolor, e então tornando o leite branco. A redução pode ocorrer em parte ou no tubo inteiro; porém, se ocorrer somente em parte do tubo, geralmente ocorre no fundo. Mesmo quando o tubo está totalmente reduzido, uma fina camada colorida geralmente permanece no topo devido à contínua reoxidação do litmus pelo oxigênio atmosférico. Isto é conveniente, uma vez que torna possível ler as reações ácido-base pela observação da cor desta pequena camada, mesmo que a maior parte do litmus no tubo esteja reduzido e não possa agir como indicador ácido-base.

Produção de gás: Gás pode ser observado visualmente pela subida do vaspar. Pequenas quantidades de gás produzem bolhas no coágulo; e grandes quantidades de bolhas podem desfazer o coágulo completamente, o que é denominado “Fermentação tormentosa”.

Coágulo doce :Alguns organismos possuem enzimas semelhantes à renina que podem coagular o leite na ausência de ácido. Neste caso, a coagulação pode ocorrer enquanto o indicador de litmus ainda está púrpura. Os coágulos doces são geralmente macios, leves e menos sólidos que os coágulos ácidos.

Proteólise ou digestão: Se a proteína do leite for digerida pelo microrganismo, o leite se torna menos opaco. Se à proteólise, parte do tubo pode tornar-se completamente claro. O líquido torna-se claro devido à quebra de proteína em pedaços menores e solúveis.

Análise microscópica foi realizada de maneira similar à indicada no item 4.10.1.

4.11 Análise estatística dos resultados

Para verificação da influência da sazonalidade, entre as contagens dos microrganismos esporulados provenientes dos lotes de requeijão 1 e 2, produzidos no inverno e verão respectivamente, foi utilizado o Teste de Médias de Tukey, em nível de 90% de significância (indicado para microrganismos), com auxílio do software Statistica versão 7.0. (Kramer *et al*, 1992).

5. Resultados e Discussão

Os resultados, para os produtos analisados nos dois lotes, são apresentados na forma de tabelas e gráficos.

Como o Lote 1 foi produzido no mês de Julho, contemplou maior recuperação de microrganismos que se adaptam ao inverno, ou seja, sob condições de temperaturas mais amenas e baixa umidade relativa. Já o Lote 2, que foi produzido no mês de Março, promoveu maior recuperação de microrganismos que se adaptam ao verão com condições de temperaturas mais elevadas e alta umidade relativa. De maneira geral as análises mostraram uma contaminação maior no Lote 2 que será discutido nas próximas seções.

No lote 2 não foram analisadas as amostras Água Ingrediente e Citrato de Sódio devido à contaminação reduzida destes ingredientes, observada em todas as análises realizadas no lote 1.

5.1. Resultado da detecção de *Listeria monocytogenes*

Na Tabela 5.1 foi apresentado o resultado da detecção de *Listeria monocytogenes* nos ingredientes, no Produto de Linha e no Produto Final referentes a 5 amostras de cada produto analisado do 1º e do 2º Lote.

Tabela 5.1. Resultado do teste de detecção de *Listeria monocytogenes* expressos em RFV* em 25 g de produto em linha de produção de requeijão.

Produto	Lotes	Amostras (RFV*/25g)					Média (RFV/25g)	Desvio Padrão
		1	2	3	4	5		
Massa Petit	1	< 0.05	< 0.05	< 0.05	< 0.05	< 0.05	< 0.05	< 0.05
Swiss	2	< 0.05	< 0.05	< 0.05	< 0.05	< 0.05	< 0.05	< 0.05
Creme	1	< 0.05	< 0.05	< 0.05	< 0.05	< 0.05	< 0.05	< 0.05
pasteurizado	2	< 0.05	< 0.05	< 0.05	< 0.05	< 0.05	< 0.05	< 0.05
Concentrado	1	< 0.05	< 0.05	< 0.05	< 0.05	< 0.05	< 0.05	< 0.05
protéico	2	< 0.05	< 0.05	< 0.05	< 0.05	< 0.05	< 0.05	< 0.05
Citrato de	1	< 0.05	< 0.05	< 0.05	NR	NR	< 0.05	< 0.05
sódio	2	NR	NR	NR	NR	NR	–	–
Água	1	< 0.05	< 0.05	< 0.05	< 0.05	< 0.05	< 0.05	< 0.05
Ingrediente	2	NR	NR	NR	NR	NR	–	–
Prod. de	1	< 0.05	< 0.05	< 0.05	< 0.05	< 0.05	< 0.05	< 0.05
linha	2	< 0.05	< 0.05	< 0.05	< 0.05	< 0.05	< 0.05	< 0.05
Produto final	1	< 0.05	< 0.05	< 0.05	< 0.05	< 0.05	< 0.05	< 0.05
	2	< 0.05	< 0.05	< 0.05	< 0.05	< 0.05	< 0.05	< 0.05

RFV: Relative Fluorescence Value

NR = não realizado

A ausência deste microrganismo em todas as amostras analisadas pode estar relacionada ao processamento aplicado ao produto, uma vez que este microrganismo não apresenta resistência térmica elevada. Este microrganismo se reproduz a baixas temperaturas de até 2°C após 65 dias (Ramsaran *et al*, 1998) aparecendo como contaminante da superfície de queijos duros com pH > 6,5. Além

disso, sua incidência no requeijão pode acontecer pós processo, já que é um microrganismo que poderia estar presente no ambiente de fabricação (Ryser & Donnelly, 2001).

5.2. Quantificação de *Staphylococcus aureus*

Na Tabela 5.2 é apresentado o resultado da contagem de *Staphylococcus aureus* nos ingredientes, no Produto de Linha e no Produto Final referentes a 5 amostras de cada produto analisado do 1º e do 2º Lote.

Tabela 5.2. Log₁₀ de UFC de *S. aureus* /g em linha de produção de requeijão.

Produto	Lotes	Amostras					Média	Desvio Padrão
		1	2	3	4	5		
Massa Petit	1	0,602	<1	<1	<1	<1	0,12	--
	2	<1	<1	<1	<1	<1	<1	--
Swiss Crème	1	<1	1	0,301	<1	<1	0,06	--
	2	<1	<1	<1	<1	<1	<1	--
Pasteurizado Concentrado	1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	--
	2	<1	<1	<1	<1	<1	<1	--
Protéico Citrato de	1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	--
	2	NR	NR	NR	NR	NR	<1	--
sódio Água	1	0,301	<1	<1	<1	<1	0,06	--
	2	NR	NR	NR	NR	NR	<1	--
Ingrediente Prod. de	1	<1	1,30	<1	<1	<1	0,26	--
	2	<1	<1	<1	<1	<1	<1	--
linha	1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	--
	2	<1	<1	<1	<1	<1	<1	--
Produto final	1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	--
	2	<1	<1	<1	<1	<1	<1	--

NR= Não realizado

Todas as amostras analisadas apresentaram um baixo nível de contaminação por *S. aureus*, sendo a Massa Petit Swiss o Produto de Linha, as

amostras do lote 1, que apresentaram maior contaminação, seguidas do Creme Pasteurizado. Mediante estes resultados foi possível concluir que a Massa Petit Swiss o Creme Pasteurizado são os ingrediente que introduz a contaminação de *S. aureus* no Produto de Linha. Como o microrganismo em questão não é esporulado, apresenta baixa resistência térmica e é suscetível à ação do conservante sorbato de potássio (Massaguer, 2006), sua presença no Produto Final não foi observada.

Após realização do teste para detecção das enzimas Coagulase e Dnase nas colônias isoladas das contagens da **tabela 5.2**, não foi confirmada a presença de *S. aureus* coagulase positiva em nenhuma das amostras analisadas. Sendo assim, as amostras se encontram de acordo com a legislação do Mercosul (1996) e Anvisa (2001) que exigem ausência de *S. aureus* coagulase positiva, no requeijão.

É importante ressaltar que a presença de *S. aureus* não patogênico na Massa Petit Swiss no Creme Pasteurizado sugere uma contaminação cruzada pelos funcionários da linha de produção e/ou exposição do ingrediente e do Produto de Linha à condições sanitárias inadequadas das superfícies que entram em contato com o alimento (Lancette & Bennett, 2001).

5.3. Quantificação de Coliformes Totais

Na Tabela 5.3 foi apresentado o resultado da contagem de Coliformes Totais nos ingredientes, no Produto de Linha e no Produto Final referentes a 5 amostras de cada produto analisado do 1º e do 2º Lote.

Tabela 5.3 Resultado da contagem NMP série de 5 tubos de Coliformes Totais em linha de produção de requeijão.

Produto	Lote	Amostras (UFC/g)					Média (UFC/g)	Desvio Padrão
		1	2	3	4	5		
Massa Petit	1	< 2	< 2	< 2	< 2	< 2	< 2	–
Swiss	2	< 2	< 2	< 2	< 2	< 2	< 2	–
Prod. de linha	1	< 2	< 2	< 2	< 2	< 2	< 2	–
	2	< 2	< 2	< 2	2	< 2	0,4	–
Creme pasteurizado	1	< 2	< 2	< 2	2	< 2	0,4	–
	2	< 2	< 2	< 2	< 2	< 2	< 2	–
Concentrado protéico	1	< 2	< 2	< 2	< 2	< 2	< 2	–
	2	< 2	< 2	< 2	< 2	< 2	< 2	–
Citrato de sódio	1	< 2	< 2	< 2	NR	NR	< 2	–
	2	NR	NR	NR	NR	NR	NR	–
Água	1	< 2	< 2	< 2	< 2	< 2	< 2	–
	2	NR	NR	NR	NR	NR	NR	–
Produto final	1	< 2	< 2	< 2	2	< 2	0,4	–
	2	< 2	< 2	< 2	< 2	< 2	< 2	–

NR = não realizado

Houve crescimento de Coliformes Totais no ingrediente Creme Pasteurizado, no Produto de Linha e no Produto Final. A presença de Coliformes Totais no Produto Final pode ser indicativo de pós-contaminação, uma vez que este é inviabilizado durante o processo térmico aplicado ao produto. Não houve crescimento de Coliformes Fecais em nenhum dos ingredientes, Produto de Linha ou Produto Final analisados.

Assim sendo, as amostras estão de acordo com as exigências do Mercosul (1996) e Anvisa (2001).

5.4. Quantificação de *C. perfringens*

A Tabela 5.4 apresenta o resultado da contagem de *C. perfringens* nos ingredientes, no Produto de Linha e no Produto Final referentes a 5 amostras de cada produto analisado do 1º e do 2º Lote.

Tabela 5.4. Resultado, em Log₁₀, da contagem de *C. perfringens* em linha de produção de requeijão.

Produto/g	Lotes	Amostras					Média	Desvio Padrão
		1	2	3	4	5		
Massa Petit Swiss	1	< 1	< 1	< 1	< 1	< 1	< 1	--
	2	< 1	< 1	< 1	< 1	< 1	< 1	--
Creme pasteurizado	1	< 1	< 1	< 1	< 1	< 1	< 1	--
	2	< 1	< 1	< 1	< 1	< 1	< 1	--
Concentrado protéico	1	< 1	< 1	< 1	0	< 1	< 1	--
	2	< 1	< 1	< 1	< 1	< 1	< 1	--
Citrato de sódio	1	< 1	< 1	< 1	NR	NR	< 1	--
	2	NR	NR	NR	NR	NR	---	---
Água Ingrediente	1	< 1	< 1	< 1	< 1	< 1	< 1	--
	2	NR	NR	NR	NR	NR	NR	--
Prod. de linha	1	< 1	< 1	< 1	< 1	< 1	< 1	--
	2	< 1	< 1	< 1	< 1	< 1	< 1	--
Produto final	1	< 1	< 1	< 1	< 1	< 1	< 1	--
	2	< 1	< 1	< 1	< 1	< 1	< 1	--

NR: não realizado

Só houve contaminação de 1 colônia de *C. perfringens* no ingrediente Concentrado Protéico, amostra 4 (lote 1) este isolado foi confirmado mediante os ensaios motilidade (-)nitrato(+) e lactose gelatina(+); não aparecendo no Produto Final. Este organismo é sensível a baixas temperaturas de estocagem perdendo sua viabilidade, porém quando ingeridos viáveis em altas concentrações, sua esporulação pode ocorrer induzindo a produção da toxina termoresistente, por isso a relevância da análise.

5.5. Quantificação de Microrganismos Mesófilos aeróbios esporulados

A Tabela 5.5 a Figura 5.1 apresentam a o resultado da contagem de microrganismos mesófilos aeróbios esporulados nos ingredientes, no Produto de Linha e no Produto Final referentes a 5 amostras de cada produto analisado do 1º e do 2º Lote.

Tabela 5.5. Log₁₀ da contagem de esporos mesófilos aeróbios por grama em linha de produção de requeijão.

Produto		Amostras					Média	Desvio Padrão
		1	2	3	4	5		
Massa Petit Swiss	1*	2.56	2.08	2.23	2.62	2.79	2.53	0.29
	2**	2.19	2.78	2.95	2.90	2.95	2.83	0.32
Creme pasteurizado	1	0.48	0.48	<1	<1	<1	0,192	0,0
	2	2.00	<1	2.30	2.00	2.48	2.24	0.24
Concentrado protéico	1	2.42	2.48	2.91	3.18	3.00	2.89	0.33
	2	2.83	2.95	2.95	2.81	2.73	2.86	0.10
Citrato de sódio	1	<1	<1	<1	NR	NR	<1	–
	2	NR	NR	NR	NR	NR	--	–
Água Ingrediente	1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	–
	2	NR	NR	NR	NR	NR	--	–
Prod. de linha	1	2.30	2.30	2.60	2.30	2.48	2.41	0.14
	2	2.60	3.11	2.95	2.78	3.04	2.90	0.21
Produto final	1	2.48	2.95	2.78	2.60	2.60	2,90	0.19
	2	3.69	3.64	3.90	3.81	3.97	3.80	0.14

*Lote 1; ** Lote 2 e NR: não realizado

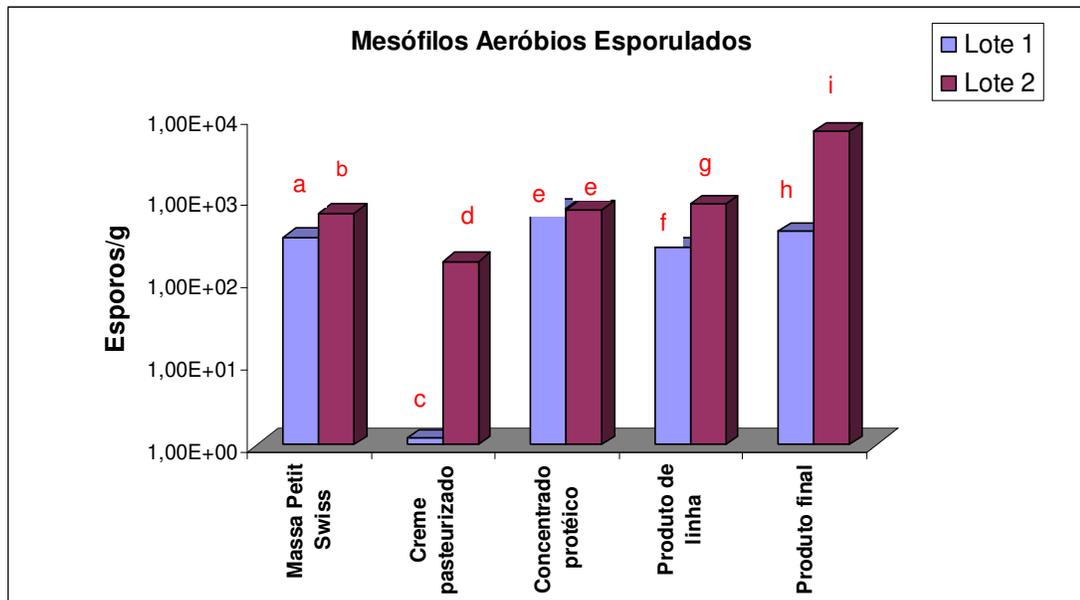


Figura 5.1. Resultado da contagem de Mesófilos Aeróbios Esporulados em linha de produção de requeijão

Nos lotes 1 e 2 os processos térmicos não causaram redução decimal positiva na população de mesófilos esporulados aeróbios, pelo contrário, o número de reduções decimais foi negativo (γ) = log população (Produto de linha) – log população (Produto Final) foi de $-0,49$ e $-0,89$, respectivamente. Isto indica que houve uma possível contaminação perigosa em ambos os lotes na linha de processo ou uma condição no Produto Final que promova a esporulação. Ocorreu um aumento de um ciclo log na contagem de esporulados aeróbios mesófilos no lote 2 na linha de processo.

Observa-se que o ingrediente Creme Pasteurizado apresentou baixa contaminação nas amostras 1 e 2 não apresentando contaminação nas amostras 3, 4 e 5, todas do Lote 1; possivelmente devido à utilização de matéria-prima menos

contaminada por estes esporos; entretanto para este ingrediente a contaminação no Lote 2 foi em média 10^2 esporos/g, provavelmente devido à utilização de matéria-prima mais contaminada ou resultado de um sub-processamento do creme, com aumento considerável de microrganismos aeróbios esporulados. O mesmo acontece com o ingrediente Massa Petit Swiss, porém o aumento da contaminação entre os Lotes 1 e 2 não é tão acentuada como no caso do Creme Pasteurizado. Isto sugere que amostras colhidas no verão (lote 2) apresentaram maior contaminação por esporulados mesófilos aeróbios.

Com relação ao Concentrado Protéico, observa-se que houve uma queda mínima no grau de contaminação do Lote 2 com relação à média do Lote 1, atestando que a temperatura e umidade relativa não afetam estes esporos quando em concentrado proteico. A contaminação dos ingredientes pode ser considerada uma das causas do aumento da contaminação do Produto de Linha, pois este recebe a carga microbiana dos ingredientes acima mencionados.

Analisando os resultados, observa-se que houve um aumento da contaminação após o tratamento térmico aplicado durante o processamento do requeijão, uma vez que o grau de contaminação por esporulados mesófilos aeróbios aumentou seguindo a mesma tendência nos dois lotes. Este fato pode ser explicado pela germinação de alguns esporos mesófilos aeróbios, durante a fusão do Produto de Linha, que não crescem, e sim, resporulam no processamento térmico gerando um Produto Final com maior população de esporos mesófilos aeróbios, desde que estes microrganismos se mantenham como esporos, não haverá degradação do produto, não afetando desta forma, a sua estabilidade.

Uma possível contaminação na linha após os trocadores de calor e/ou linha e envase poderia incrementar a concentração dos esporos conforme observado nestes resultados e já discutido por Hoffmann *et al* (2001). Seria recomendável realizar ensaios de monitoramento da contaminação na linha no correspondente segmento a entrada e saída dos trocadores. De maneira geral, a concentração dos esporos mesófilos aeróbios foi maior no lote 2 indicando a maior contaminação por estes esporulados no verão.

Pela análise estatística dos resultados pode-se observar que para a contagem de mesófilos esporulados aeróbios, dentre os ingredientes analisados, a Massa Petit Swiss, o Creme Pasteurizado, Produto de Linha e o Produto Final apresentaram diferença significativa ($p < 0,1$) entre os lotes de inverno e verão, apesar de ter sido observado um pequeno aumento na contagem quando se considera ambos os lotes na maioria dos outros ingredientes analisados. Sendo assim, é possível se deduzir que esta diferença significativa entre a contaminação dos lotes de inverno e verão, notada para mesófilos esporulados aeróbios, no Produto Final e devida principalmente ao aumento da contaminação da Massa Petti Swiss que se reflete no Produto de Linha e no Produto Final.

5.6. Quantificação de Microrganismos Termófilos Aeróbios Totais Esporulados

Esta classe de microrganismo engloba tanto os microrganismos causadores de “Flat Sour” termofílicos e acidúricos esporulados, como também os microrganismos aeróbios alcalinizantes capazes de crescer a 55 °C. A Tabela 5.6 e a Figura 5.2

apresentam a o resultado da contagem de microrganismos termófilos aeróbios esporulados nos ingredientes, no Produto de Linha e no Produto Final referentes a 5 amostras de cada produto analisado do 1º e do 2º Lote.

Tabela 5.6. Log₁₀ da contagem total de esporos Termófilos Aeróbios por 10 g do produto em linha de produção de requeijão.

Produto		Amostra					Média	Desvio Padrão
		1	2	3	4	5		
Massa Petit Swiss	1*	2.2	2.3	2.4	2.2	2.2	2.26	0.1
	2**	1.6	2.3	2.3	2.2	2.6	2.2	0.4
Creme pasteurizado	1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	–
	2	1.0	1.4	0.7	1.0	1.4	1.2	0.3
Concentrado protéico	1	2.5	2.3	2.4	2.4	2.3	2.4	0.1
	2	4.3	4.2	4.3	4.1	4.3	4.2	0.1
Citrato de sódio	1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	–
	2	NR	NR	NR	NR	NR	–	–
Água Ingrediente	1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	–
	2	NR	NR	NR	NR	NR	–	–
Prod. de linha	1	2.8	3.0	2.8	3.0	2.9	2.9	0.1
	2	2.5	2.6	2.7	2.9	2.9	2.8	0.2
Produto final	1	0.7	1.4	1.3	1.6	1.0	1.3	0.4
	2	1.8	1.5	1.4	0.7	1.4	1.5	0.4

*Lote 1; ** Lote 2.NR: não realizado

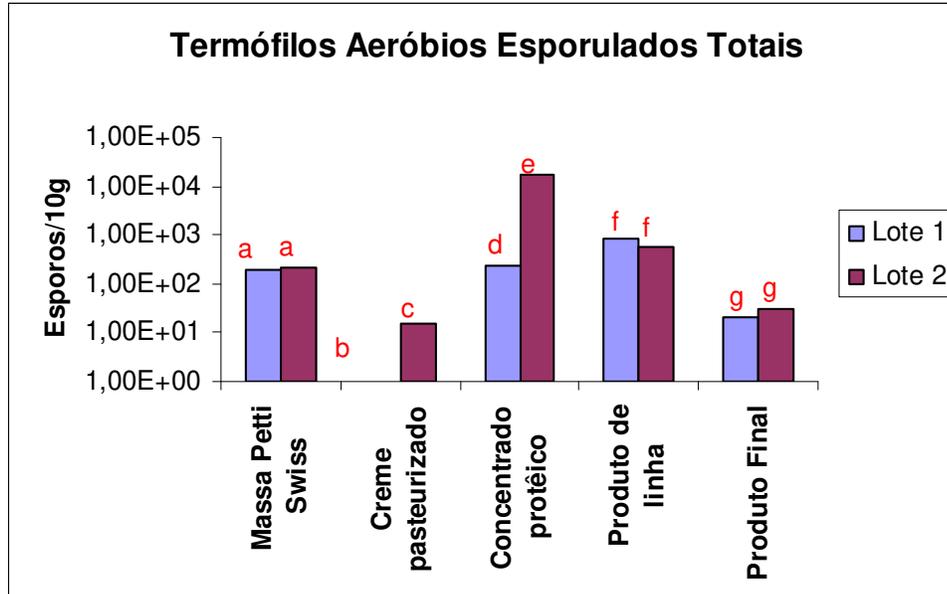


Figura 5.2 Resultado da contagem Total de Termófilos Aeróbios Esporulados em linha de produção de queijo

O ingrediente Concentrado Protéico foi o que apresentou maior contaminação alcançando 10^4 esporos/10 g no Lote 2, cabe salientar que esta foi a maior contagem verificada no levantamento. A Massa Petit Swissé o segundo ingrediente mais contaminado, apresentando o mesmo grau de contaminação no Lote 2 em torno de 10^2 esp/10g.

O mesmo aumento populacional ocorre com o ingrediente Creme Pasteurizado, que não apresentou contaminação no Lote 1, porém apresentou aumento de 1 ciclo logarítmico no Lote 2.

O alto grau de contaminação dos ingredientes acarreta em um Produto Linha com uma população microbiana atingindo 10^3 esporos/10g. Apesar da alta contaminação do Produto de Linha, o processo térmico aplicado parece não ter sido

eficaz para esta classe de microrganismo, uma vez que o número de reduções decimais é baixo. (γ) = +1.6 e + 1.3, para Lote 1 e 2 respectivamente.

A contaminação das amostras se caracterizou por microrganismos que apresentavam crescimento superficial de colônias alcalinizantes com liberação de exsudado no meio Dextrose Triptona Agar (DTA). Isto principalmente no Concentrado Protéico onde a fonte de energia vem da quebra da proteína com conseqüente produção de amônia que eleva o pH. É cabido salientar que o concentrado protéico utilizado é composto de proteína de leite B ou C, sendo concentrada e seca em “spray drier”, portanto a contaminação deste produto é resultado direto da contaminação de esporos verificado no leite que se concentra na secagem.

Mediante os resultados, os microrganismos Termófilos Aeróbios Esporulados parecem esporular mais no verão e, por isso, de maneira geral, sua recuperação foi maior no lote 2.

Pela análise estatística dos resultados pode-se observar que dentre os ingredientes analisados somente o Creme Pasteurizado e o Concentrado Proteico apresentaram diferença significativa ($p < 0,1$) entre os lotes de inverno e verão, Entretanto após análise estatística, é possível deduzir que esta diferença significativa entre a contaminação, não afeta o Produto de Linha nem o Produto Final.

5.7. Quantificação de Microrganismos Termofílicos Aeróbios Esporulados

A Tabela 5.7 apresenta o resultado da contagem de microrganismos termofílicos aeróbios esporulados nos ingredientes, no Produto de Linha e no Produto Final referentes a 5 amostras de cada produto analisado do 1º e do 2º Lote. A Figura 5.3 mostra o gráfico correspondente a esta tabela.

Tabela 5.7. Resultados da contagem em Log₁₀ de esporos termofílicos causadores de deterioração *Flat Sour* por 10 g em linha de produção de requeijão.

Produto		Amostra					Média	Desvio Padrão
		1	2	3	4	5		
Massa Petit Swiss	1*	1.0	1.7	1.6	1.3	0.7	1.3	0.4
	2**	1.0	1.8	2.1	1.7	2.5	1.8	0.6
Creme pasteurizado	1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	–
	2	<1	<1	<1	<1	<1	<1	–
Concentrado protéico	1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	–
	2	2.8	3.0	2.7	2.8	2.8	2.8	0.1
Citrato de sódio	1	<1	<1	<1	NR	NR	<1	–
	2	NR	NR	NR	NR	NR	NR	–
Água Ingrediente	1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	–
	2	NR	NR	NR	NR	NR	NR	–
Prod. de linha	1	1.6	1.9	2.4	2.7	2.4	2.2	0.4
	2	2.2	2.2	2.3	2.5	2.5	2.3	0.2
Produto final	1	<1	1.3	1.3	0.7	0.7	0.8	0.5
	2	1.0	1.2	1.0	<1	<1	0.6	0.58

*Lote 1; ** Lote 2. NR: não realizado

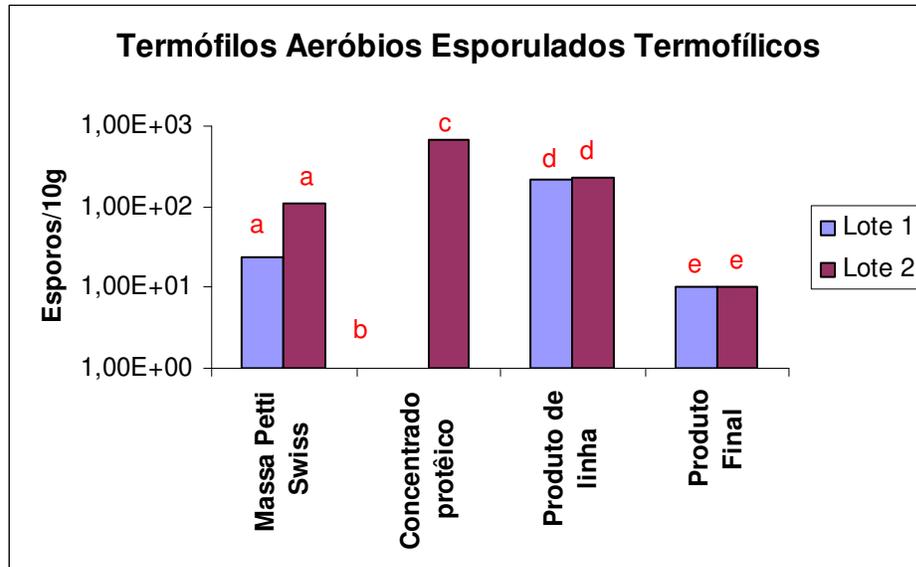


Figura 5.3 Resultado da contagem esporos causadores de “Flat Sour” termofílico em linha de produção de requeijão.

O processamento térmico reduziu da população de esporos termofílicos aeróbios do Produto de Linha, mas não eliminou esta contaminação no Produto Final, o número de reduções decimais (γ) = +1.4 e + 1.7, no entanto as condições de anaerobiose e de refrigeração fatalmente impedirão ou dificultarão, que estes esporos remanescentes do tratamento UHT germinem no Produto Final durante sua vida de prateleira, fato que foi observado no acompanhamento da vida de prateleira.

Observa-se que a contaminação de termófilos aeróbios esporulados causadores de Flat-sour na Massa Petit Suisse no Concentrado Protéico foi maior no Lote 2, provavelmente devido às condições climáticas mais quentes que favorecem a contaminação destes microrganismos na principal matéria-prima do Requeijão, o leite. Apesar do Creme Pasteurizado conter o mesmo leite da massa Petit Swiss.

Os ingredientes Creme Pasteurizado, Citrato de Sódio e Água ingrediente não apresentaram contaminação.

De maneira geral, a concentração dos esporos termófilos aeróbios foi maior no lote 2 indicando a maior contaminação por estes esporulados nesta estação do ano.

De acordo com a análise estatística, observou-se que o único ingrediente que apresentou variação significativa ($p < 0,1$) entre os lotes de inverno e verão foi o Concentrado Protéico, entretanto esta alta contaminação no lote 2, não afetou o Produto Final.

5.8. Quantificação de Microrganismos Termófilos Esporulados Acidúricos causadores de “Flat Sour”

Na Tabela 5.8 e Figura 5.4 são mostrados os resultados da contagem de microrganismos termófilos acidúricos aeróbios esporulados nos ingredientes, no Produto de Linha e no Produto Final referentes a 5 amostras de cada produto analisado do 1º e do 2º Lote.

Tabela 5.8. Resultados da contagem em Log₁₀ de esporulados acidúricos por 10 g causadores de “Flat Sour” em linha de produção de requeijão.

Produto		Amostra					Média	Desvio Padrão
		1	2	3	4	5		
Massa Petit Swiss	1*	1.90	2.28	2.20	2.18	2.04	2.12	0.15
	2**	0.70	1.70	1.54	1.40	1.18	1.30	0.39
Creme pasteurizado	1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	–
	2	<1	<1	<1	<1	<1	<1	–
Concentrado protéico	1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	–
	2	2.30	2.48	2.54	2.54	2.54	2.48	0.11
Citrato de sódio	1	<1	<1	<1	NR	NR	<1	–
	2	NR	NR	NR	NR	NR	–	–
Água Ingrediente	1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	–
	2	NR	NR	NR	NR	NR	–	–
Prod. de linha	1	2.13	2.25	2.85	2.97	2.92	2.62	0.40
	2	1.90	2.10	2.18	2.51	2.27	2.19	0.22
Produto final	1	<1	0.70	<1	1.30	0.70	0.54	0.55
	2	0.70	0.70	1.18	0.70	0.70	0.79	0.21

*Lote 1; ** Lote 2 e NR: não realizado

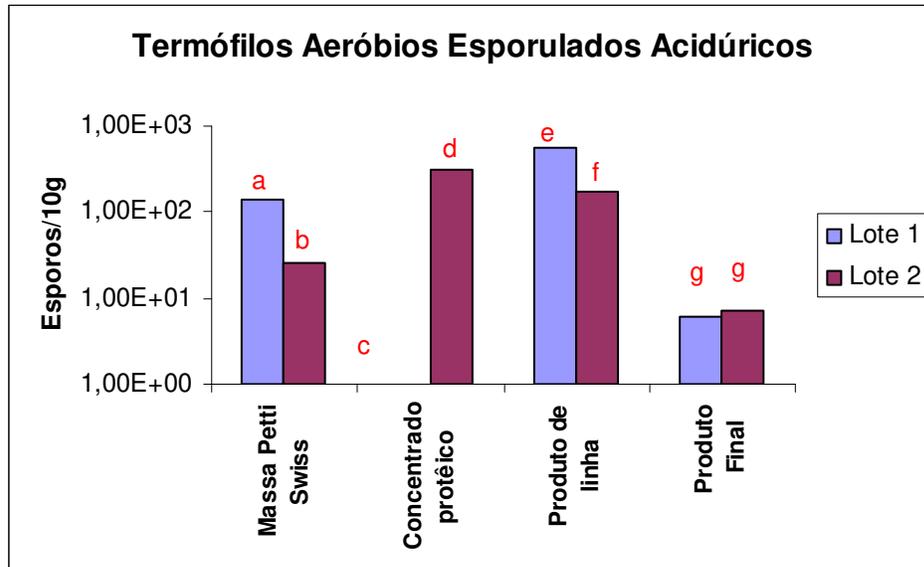


Figura 5.4 Resultado da contagem Esporulados Acidúricos em linha de produção de requeijão.

Os ingredientes Creme Pasteurizado, Citrato de Sódio, e Água ingrediente, não apresentaram contaminação por termófilos acidúricos esporulados.

Tanto o ingrediente Massa Petit Swiss como o Produto de Linha, apresentam uma queda da população esporulada no Lote 2. Possivelmente devido à utilização de matéria-prima menos contaminada e/ou pelo fato destes esporulados serem veiculados sob temperaturas mais amenas, crescendo a partir de 37°C, e baixa umidade relativa, ou seja, no inverno sua esporulação parece se intensificar. Isto com exceção do concentrado protéico onde no lote 2 houve incremento a contaminação, de forma similar ao observado para “Flat Sour” termofílico e esporulados termófilos totais.

Este tipo de análise contempla a recuperação de microrganismos acidófilos, por isso, a contaminação da massa petit swiss (pH = 4,6) apresentou bactérias

esporuladas que, consumindo o substrato produziram ácido (colônias brancas com halo amarelo). No caso do Concentrado Protéico os esporulados utilizam proteína como fonte de nitrogênio liberando amônias e mantendo o meio DTA na cor púrpura.

As condições de anaerobiose geradas nas embalagens do Requeijão Cremoso e a manutenção das embalagens sob temperatura de refrigeração criam uma barreira para o desenvolvimento deste microrganismo, sendo uma dessas a razão de uma contaminação teoricamente baixa deste grupo de microrganismos causadores de *Flat Sour* no Produto Final.

O processo térmico apresentou a mesma tendência de redução da carga de esporos apresentando valores de γ de +2.08 para 1º lote e +1.4 para o 2º lote, sendo que no lote 1 os esporos parecem menos resistentes do que no lote 2 já que maior concentração proporcional foi eliminada. De maneira geral o processo térmico do requeijão não está desenhado para eliminação de esporulados termófilos.

Conforme análise estatística, conclui-se que todos os ingredientes, com exceção do Creme Pasteurizado, apresentaram variação significativa entre o lote 1 e 2 esta variação não é tão acentuada no Produto de Linha, não afetando, estatisticamente o Produto Final.

5.9. Quantificação de Microrganismos Mesófilos anaeróbios esporulados.

O resultado da contagem de microrganismos mesófilos anaeróbios esporulados nos ingredientes, no Produto de Linha e no Produto Final referentes a 5

amostras de cada produto analisado do 1º e do 2º Lote, está mostrado na Tabela 5.9 e na Figura 5.5 correspondente. Como estas análises são semi-quantitativas, não podem ser comparadas com os resultados de contagens obtidas para mesófilos e termófilos aeróbios. Assim sendo, o resultado indicativo foi analisado em porcentagem de contaminação.

Tabela 5.9 Resultado de Mesófilos Anaeróbios Esporulados expressos em % de tubos positivos de 6 inoculados em linha de produção de requeijão

Produto/20g	Lote	Amostra (% contaminada)					Média (%)	Desvio Padrão
		1	2	3	4	5		
Massa Petit Swiss	1*	83	33	83	83	67	70	22
	2**	83	83	100	100	100	93	9
Creme pasteurizado	1	17	17	17	17	-	14	7
	2	50	17	17	50	50	37	18
Concentrado protéico	1	50	83	83	83	100	80	18
	2	67	67	33	67	83	63	18
Citrato de sódio	1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	-
	2	NR	NR	NR	NR	NR	-	-
Água Ingrediente	1	<1	17	<1	<1	<1	3	8
	2	NR	NR	NR	NR	NR	-	-
Prod. de linha	1	100	92	97	95	97	92	3
	2	100	100	100	100	100	100	-
Produto final	1	33	17	17	33	0	20	14
	2	66	67	67	50	66	63	7

*Lote 1; ** Lote 2 e NR: não realizado

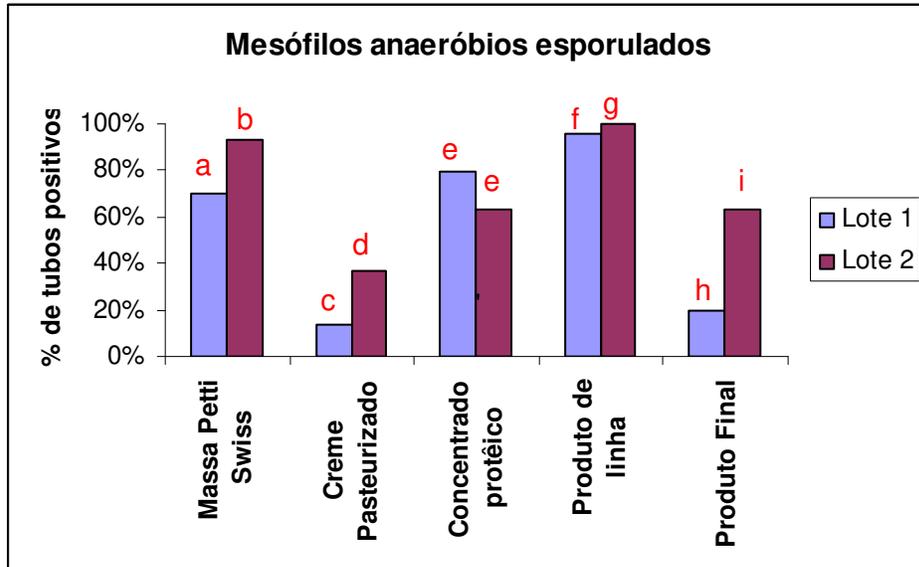


Figura 5.5 Resultado de mesófilos anaeróbios esporulados expressos em % de tubos positivos de 6 inoculados dos Lote 1 e 2 em linha de produção requeijão.

O ingrediente Citrato de Sódio não apresentou contaminação no Lote 1 de mesófilos anaeróbios esporulados. O ingrediente Água teve apenas 16,7% de contaminação na amostra 2 do Lote 2. O ingrediente Massa Petit Swiss foi o mais contaminado apresentando um aumento da contaminação no Lote 2 atingindo mais de 90% de tubos positivos, o ingrediente Creme Pasteurizado também apresentou aumento da contaminação, possivelmente devido ao uso de matéria-prima mais contaminada. Assim sendo, a Massa Petit Swiss o Concentrado Protéico parecem ser os responsáveis pela alta concentração dos anaeróbios mesófilos esporulados e/ou *Bacillus* facultativos que foram recuperados nas análises do Produto de Linha.

Mais uma vez o processamento térmico reduziu o número de esporos mesófilos anaeróbios em 72% para o 1º lote e 37% para o 2º lote, mas não eliminou

esta contaminação. Esta classe de microrganismos, que engloba o Gênero *Clostridium* e *Bacillus* anaeróbios facultativos possuem alta resistência térmica ainda mais num produto como requeijão que é rico em proteínas e cálcio, sendo dificilmente eliminados durante o processamento térmico aplicado na fabricação do Produto Final.

Em todas as amostras que apresentaram contaminação por esporos mesófilos anaeróbios a concentração no lote 2 foi sempre maior, com exceção do Concentrado Protéico, provavelmente devido à utilização de matéria-prima menos contaminada e/ou menor adaptação destes esporos em condições de temperaturas mais elevadas com alta umidade relativa em meio com pouco carboidrato e muita proteína como é o caso do Concentrado Protéico.

De acordo com a análise estatística, conclui-se que todos os ingredientes apresentaram variância significativa ($p < 1$) entre os dois lotes analisados. Esta diferença estatística comprovada entre a maioria dos ingredientes, gera um produto final com uma diferença de contaminação acentuada.

5.10. Quantificação de Termófilos anaeróbios esporulados

O resultado da contagem de microrganismos termófilos anaeróbios esporulados nos ingredientes, no Produto de Linha e no Produto Final referentes a 5 amostras de cada produto analisado do 1º e do 2º Lote. está mostrado na Tabela 5.10 na Figura 5.6 correspondente. Como estas análises também são semi-quantitativas, não podendo ser comparadas com os resultados obtidos para mesófilos e termófilos aeróbios. Assim sendo, o resultado indicativo foi analisado em porcentagem de

contaminação.

Tabela 5.10 Resultado de termófilos anaeróbios esporulados expressos em % de tubos positivos de 6 inoculados em linha de produção de requeijão.

Produto		% de tubos positivos nas					Média (%)	Desvio Padrão
		Amostras						
		1	2	3	4	5		
Massa Petit	1	17	50	17	33	33	30	14
Swiss	2	50	50	50	50	50	50	–
Creme	1	0	0	17	17	0	7	9
pasteurizado	2	0	0	0	0	17	3	7
Concentrado	1	67	50	33	33	17	40	19
protéico	2	67	67	50	50	67	60	9
Citrato de sódio	1	<1	<1	<1	NR	NR	NR	–
	2	NR	NR	NR	NR	NR	–	–
Água Ingrediente	1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	–
	2	NR	NR	NR	NR	NR	–	–
Prod. de linha	1	33	0	33	33	17	23	15
	2	50	33	50	50	33	43	9
Produto final	1	0	0	17	0	0	3	8
	2	17	0	17	17	0	10	9

NR: não realizado

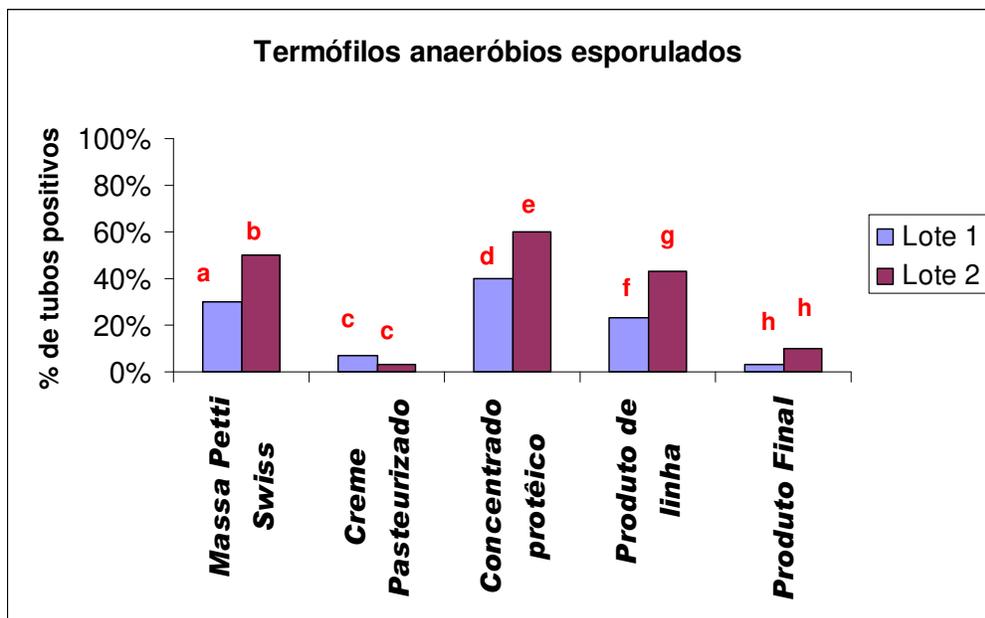


Figura 5.6 Resultado de termófilos anaeróbios esporulados expressos em % de tubos positivos de 6 inoculados no Lote 1 e 2, na linha de produção de requeijão.

Todos as amostras analisadas apresentaram um aumento no grau de contaminação no Lote 2, com exceção do ingrediente Creme Pasteurizado.

O Concentrado Protéico foi o que apresentou maior contaminação atingindo aproximadamente 60% de tubos positivos, seguido da Massa Petit Swiss. A alta contaminação dos ingredientes resulta em Produto de Linha também altamente contaminado uma vez que este recebe a carga de contaminantes dos ingredientes.

Apesar do Produto Final apresentar uma baixa contaminação por microrganismos termófilos anaeróbios, estes encontram a condição ideal de anaerobiose para seu crescimento nas embalagens do Requeijão Cremoso, porém, devido à baixa temperatura de estocagem o desenvolvimento desses microrganismos é prejudicado.

Em todas as amostras que apresentaram contaminação por esporos termófilos aeróbios a concentração no lote 2 foi sempre maior, com exceção do Creme Pasteurizado. Já no Concentrado Protéico a contaminação foi muito maior do que todas as outras, inclusive na análise de mesófilos anaeróbios.

Para esta classe de microrganismos o tratamento térmico causou redução na carga microbiana de 20% e 33% para o 1º e 2º lote respectivamente demonstrando não ser totalmente eficaz.

De acordo com análise estatística, conclui-se que os ingredientes que apresentaram diferença significativa ($p < 1$) foram a Massa Petit Swiss, Concentrado Protéico e Produto de Linha. De acordo com a baixa variação da contaminação entre os dois lotes do ingrediente Creme Pasteurizado e Produto Final, estatisticamente também não houve variação significativa entre os lotes.

5.11. Número de microrganismos isolados referentes ao Lote 1

A Tabela 5.11 apresenta o número de isolados de todas as análises de esporulados do Lote 1 totalizando 207 isolados. Foram isolados, no máximo, 3 colônias distintas de cada análise de microrganismos esporulados, pois eles tiveram incidência significativa em toda linha de processo e no Produto Final. O número de isolados recuperados foi bem mais alto do que o esperado, sendo superior no lote 2.

Tabela 5.11. Número de isolados esporulados referentes ao Lote 1.

Produto	Mesófilo Aeróbio	Mesófilo Anaeróbio	Termófilo Aeróbio	Termófilos Anaeróbio	TOTAL
Massa Petit Suiss	15	12	15	11	53
Produto de linha	15	15	15	7	52
Creme pasteurizado	4	4	0	0	8
Concentrado proteico	15	15	15	10	55
Citrato de sódio	0	0	0	0	0
Água	0	1	0	0	1
Produto final	15	6	15	2	38
TOTAL	64	53	60	30	207

Mediante a tabela acima a contaminação da linha de processo e de Produto Final engloba os esporulados mesófilos e termófilos aeróbios seguidos dos mesófilos e termófilos anaeróbios. O maior número de isolados é proveniente do ingrediente Concentrado Protéico, seguido da massa Petit Swiss. Destaca-se que o grupo de maior número isolados foi o dos mesófilos aeróbios esporulados.

5.12. Número microrganismos isolados referentes ao Lote 2

A Tabela 5.12 apresenta o número de isolados de todas as análises de esporulados do Lote 2. Tanto os procedimentos quanto os critérios foram os mesmos adotados para o lote 1.

Tabela 5.12 Número de isolados esporulados referentes ao Lote 2

Produto	Mesofilo Aeróbio	Mesofilo Anaeróbio	Termófilo Aeróbio	Termófilos Anaeróbio	TOTAL
Massa Petit Suiss	15	15	15	15	60
Produto de linha Creme	7	11	13	1	32
pasteurizado	15	15	14	15	59
Concentrado proteico	15	15	30	13	73
Produto final	15	13	15	3	46
TOTAL	67	69	87	47	270

O perfil da contaminação do lote 2 foi bem semelhante ao do lote 1, porém os mesófilos e termófilos anaeróbios e aeróbios tiveram contagem mais altas nas amostras do lote 2 em relação ao lote 1. Isto é função da estação do ano que seleciona a flora esporulada do ambiente, contaminando assim os ingredientes e o Produto Final. O ingrediente com maior número de isolados também foi o Concentrado Protéico.

5.13. Acompanhamento da vida de prateleira do Requeijão

Cremoso

Os resultados referentes ao acompanhamento do Requeijão Cremoso são apresentados na forma de tabelas e os correspondentes gráficos para os produtos analisados. Durante todo o estudo as amostras foram estocadas refrigeradas a 4°C e analisadas semanalmente durante 50 dias simulando a vida de prateleira do produto nas condições de estocagem indicadas pelo processador.

Durante todo o experimento foi medido o pH do produto conforme a Tabela 5.13 e a correspondente Figura 5.7.

Tabela 5.13: Variação do pH durante a vida de prateleira de requeijão.

		Data da análise							
Amostra	1	8	15	22	29	36	43	50	
1	5,83	5,83	5,81	5,83	5,85	5,82	6,56	5,75	
2	5,81	5,81	5,83	5,83	5,81	5,83	5,73	5,74	
3	5,81	5,82	6,78	5,82	5,83	5,80	5,77	5,87	
4	5,84	5,81	5,81	5,83	5,79	6,07	5,82	5,77	
5	5,76	5,80	5,83	5,82	5,81	5,81	5,76	5,76	
média	5,81	5,81	6,01	5,83	5,82	5,87	5,93	5,78	

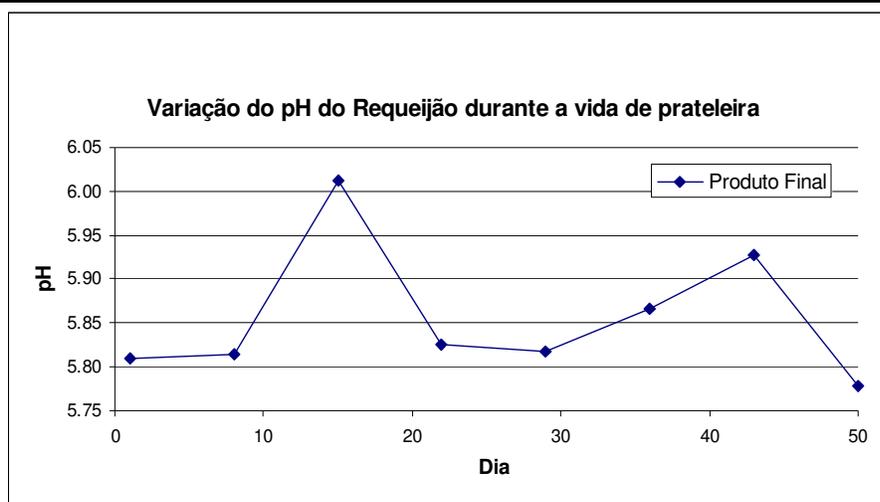


Figura 5.7: Variação da média do pH durante a vida de prateleira de requeijão

Apesar da variação de pH ser baixa, esta pode ser correlacionada com o aumento da esporulação de anaeróbios mesófilos e termófilos e com a possível germinação de mesófilos aeróbios esporulados cujo metabolismo de degradação das proteínas alcalinizou o sistema. Rapacci, (1997), cita que a manutenção de pH entre 5,6 e 5,8 inibe o crescimento dos esporulados butíricos, no caso do presente estudo,

durante toda a vida de prateleira o pH se manteve acima de 5,8, possibilitando portanto o crescimento destes microrganismos.

5.14. Resultado da detecção de *Listeria monocytogenes*, contagem de *Staphylococcus aureus*, Coliformes Totais e de *Clostridium perfringens*

Não houve contaminação do Requeijão Cremoso durante a vida de prateleira, por nenhum dos microrganismos acima mencionados. Sendo assim, o produto analisado se encontra de acordo com as exigências do Mercosul (1996), e da Anvisa (2001) até o final da vida de prateleira, mantidos à 4°C, sem indícios de contaminação cruzada e/ou perda de hermeticidade da embalagem pós-processo. O problema deste tipo de produto quando estocado em condições de temperatura de abuso, limita-se a ação dos esporulados que podem germinar, crescer e deteriorar o produto.

5.15. Quantificação de Mesófilos aeróbios esporulados durante a vida de prateleira do produto.

A Tabela 5.14 e a Figura 5.8 apresentam o resultado da contagem de microrganismos mesófilos aeróbios esporulados durante a vida de prateleira do Requeijão Cremoso.

Tabela 5.14: Resultado da contagem em Log_{10} de Mesófilos Aeróbios Esporulados/g durante a vida de prateleira do requeijão

Amostra	1º dia	8º dia	15º dia	22º dia	29º dia	36º dia	43º dia	50º dia
1	3,7	0,3	1,5	2,3	2,0	2,0	2,6	2,6
2	3,6	2,2	2,0	2,0	1,3	0,7	1,3	2,3
3	3,9	2,3	1,0	1,6	1,3	1,3	2,0	0,0
4	3,8	3,0	1,3	2,5	1,8	2,0	2,3	1,8
5	4,0	2,3	1,3	2,0	1,0	2,3	2,5	1,0
Media	3,8	2,5	1,6	2,2	1,6	1,9	2,3	2,2

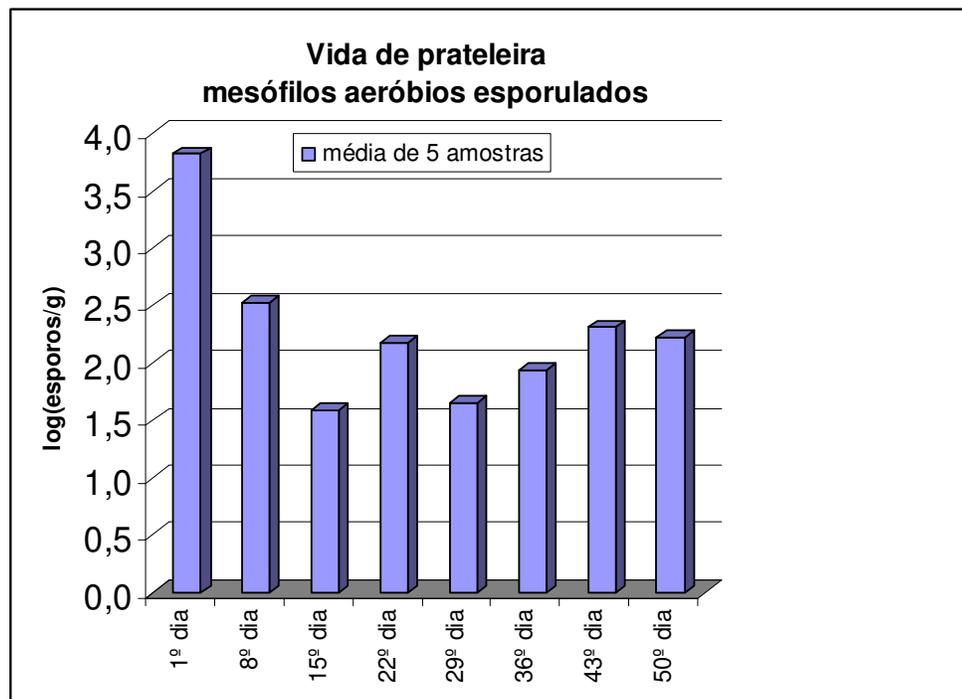


Figura 5.8: Evolução da média da população de mesófilos aeróbios esporulados em requeijão durante a vida de prateleira.

O 1º dia de análise foi o que apresentou maior contaminação (3,8 log₁₀ esporos/g) por microrganismo aeróbios esporulados. No 8º e 15º dia ocorreu um declínio da contaminação destes esporos, entretanto observa-se que ocorre uma reesporulação deles no 22º dia de vida de prateleira análise que diminui no 29º dia. No 36º e 43º dia ocorre um aumento da população microbiana, que permanece estável até o 50º dia.

A diminuição da contaminação por microrganismos aeróbios esporulados após o 1º dia é possivelmente explicada pela germinação destes esporos utilizando fontes de carbono para obtenção de energia, provenientes dos carboidratos do produto. Isto pode ocorrer devido à existência de espécies psicrótróficas, adaptadas à temperatura de refrigeração. Após re-esporulação deles, por possível esgotamento de carboidratos, ocorre a adaptação ao novo ambiente com posterior germinação utilizando fonte de nitrogênio como substrato para obtenção de energia.

Comparando o perfil da esporulação dos mesófilos aeróbios com a flutuação de pH do produto durante a vida de prateleira percebe-se que a partir da 15º dia o pH cai de 6,01 para 5,83, ou seja, 0,18 justamente quando a população viável de mesófilos atinge a concentração máxima, ou seja, o número de esporos diminui por possível germinação devido às condições do produto durante a estocagem. von Bockelmann (1988) afirma que um dos indicadores de falta de esterilidade comercial seria a flutuação de no mínimo 0,2 no valor do pH de um produto. Apesar da variação para esta análise ter sido de 0,18 e pelo fato da flutuação de pH não poder ser justificada somente pela temperatura de estocagem, já que, a 4°C a tendência do pH é elevar-se e/ou manter-se estável como observado por Pacheco, (2005) para leite integral UHT

incubado a 37°C e a 7°C por 10 dias; com relativa margem de segurança a variação de pH obtida é resultado indicativo da atividade microbiana.

5.16. Quantificação de termófilos aeróbios esporulados durante a vida de prateleira do produto

A Tabela 5.15 e a Figura 5.9 apresentam o resultado da contagem de microrganismos termófilos esporulados durante a vida de prateleira do Requeijão Cremoso

Tabela 5.15: Resultados da contagem em Log₁₀ de Termófilos Aeróbios Esporulados/10g durante a vida de prateleira do requeijão

Amostra	1º dia	8º dia	15º dia	22º dia	29º dia	36º dia	43º dia	50º dia
1	1,8	1,4	1,0	1,0	1,2	1,5	0,7	1,5
2	1,5	1,2	1,2	1,7	1,7	1,7	1,3	1,4
3	1,4	1,4	1,0	1,5	1,3	1,2	1,4	1,5
4	0,7	1,3	1,7	1,0	1,5	1,5	1,6	1,5
5	1,4	1,2	1,6	1,2	1,0	1,4	1,5	1,2
Media	1,5	1,3	1,4	1,4	1,4	1,5	1,4	1,4

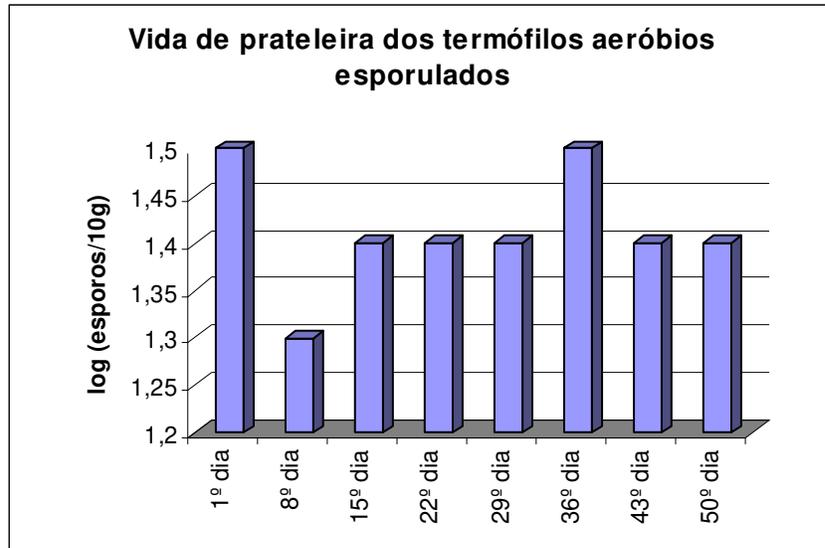


Figura 5.9: Evolução da média da população de termófilos aeróbios esporulados durante a vida de prateleira do requeijão.

O primeiro dia de análise foi o que apresentou maior contaminação destes esporos, apresentando uma queda no 8º dia, por possível germinação conforme justificado para os mesófilos aeróbios, só que neste caso os termófilos aeróbios elevaram o pH do produto, conforme apresentado na figura acima, já que as colônias recuperadas alcalinizaram o meio utilizado para contagem.

Ocorre um aumento da população esporulada a partir do 15º dia atingindo o pico no 36º dia. Depois disso, nova germinação utilizando fonte de nitrogênio com rápida resporulação no 50º dia.

Analisando a população de termófilos e mesófilos aeróbios esporulados durante a vida de prateleira do requeijão é importante ressaltar que o grupo dos termófilos em ambiente refrigeração do mostraram tendência de se manterem na sua

forma de esporos com tendência a estabilizar a população em torno de $1.4 \log_{10}$ esporos/10g, pois as condições para este grupo são bem mais adversas do que para os mesófilos, já que deste último grupo fazem parte os psicrotópicos que podem tolerar ambientes refrigerados conseguindo portanto, germinar e se transformar na sua forma vegetativa ou resporular durante a vida de prateleira, atingindo uma estabilização em torno de $2 \log_{10}$ esporos/1g (vide Figura 5.8 e 5.9).

5.17. Quantificação de mesófilos anaeróbios esporulados durante a vida de prateleira do produto

A Tabela 5.16 apresenta o resultado da contagem de microrganismos mesófilos anaeróbios esporulados durante a vida de prateleira do Requeijão Cremoso. A Figura 5.10 mostra o gráfico correspondente à esta tabela.

Tabela 5.16: Resultado em % do número de tubos positivos / 6 tubos inoculados para Mesófilos Anaeróbios Esporulados durante a vida de prateleira do requeijão

Amostra	1º dia	8º dia	15º dia	22º dia	29º dia	36º dia	43º dia	50º dia
1	67	0	83	67	33	50	17	33
2	67	67	100	67	33	50	17	33
3	33	17	17	33	50	50	17	17
4	50	67	83	33	33	67	50	33
5	67	33	83	50	67	50	50	17
Media	57	46	73	50	43	53	30	27

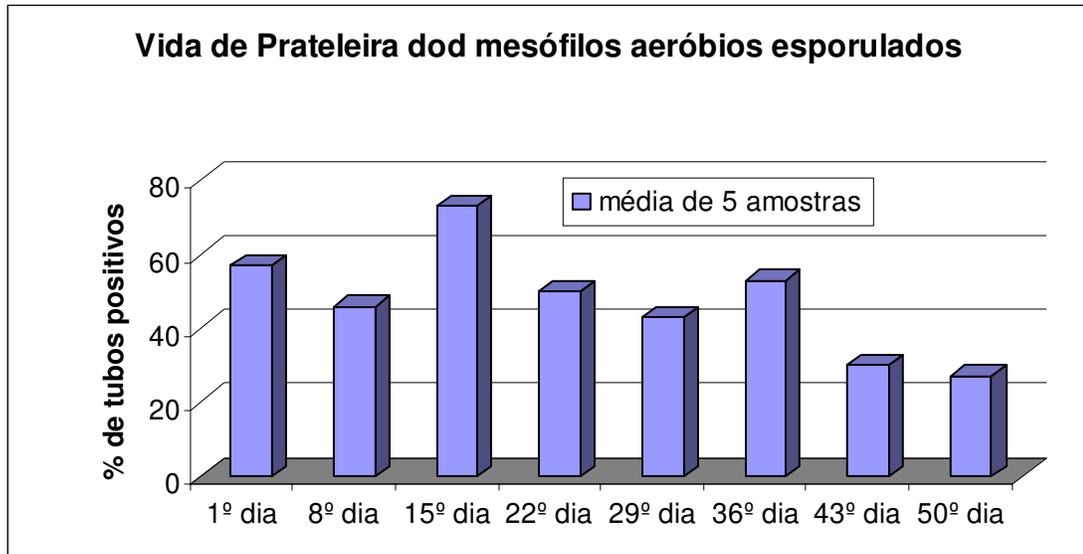


Figura 5.10 Evolução da média da população de mesófilos anaeróbios esporulados em requeijão durante a vida de prateleira do requeijão.

De acordo com a figura acima observa-se que no 15º dia houve o primeiro pico de resporulação. Após este período, o crescimento vegetativo microbiano possivelmente aumenta e a porcentagem de esporos cai, com novo pico no 36º dia, seguido de nova germinação e crescimento seguindo esta tendência.

Como os microrganismos aeróbios consomem o oxigênio dissolvido no interior da embalagem criam condições, reduzindo o substrato, para que os anaeróbios germinem, este parece ser um padrão de comportamento seqüencial, sinérgico entre estes dois grupos. Outro aspecto que parece estar relacionado com este comportamento centra-se no fato de que, nos picos de maior esporulação o microrganismo está submetido a um pH mais básico no produto. Isto também foi observado para o pico de menor esporulação, ou seja, onde houve maior germinação quando o produto atingiu seu pH comercial próximo de 5,8. Alguns dos mesófilos

anaeróbios apresentaram atividade facultativa com fonte de energia podendo ser proteolítica ou não proteolítica.

5.18. Quantificação de termófilos anaeróbios esporulados durante a vida de prateleira do produto

A Tabela 5.17 apresenta o resultado da contagem de microrganismos termófilos anaeróbios esporulados durante a vida de prateleira do Requeijão Cremoso.

A Figura 5.11 apresenta o gráfico correspondente a esta tabela.

Tabela 5.17: Resultado em % de tubos positivos da análise de Termófilos Anaeróbios Esporulados durante a vida de prateleira do requeijão

Amostra	1º dia	8º dia	15º dia	22º dia	29º dia	36º dia	43º dia	50º dia
1	17	17	50	67	67	83	33	50
2	0	17	33	83	50	17	33	33
3	17	50	50	100	17	17	0	33
4	17	0	33	83	17	0	50	33
5	0	17	50	83	50	50	50	17
Media	17	25	43	83	40	42	42	33

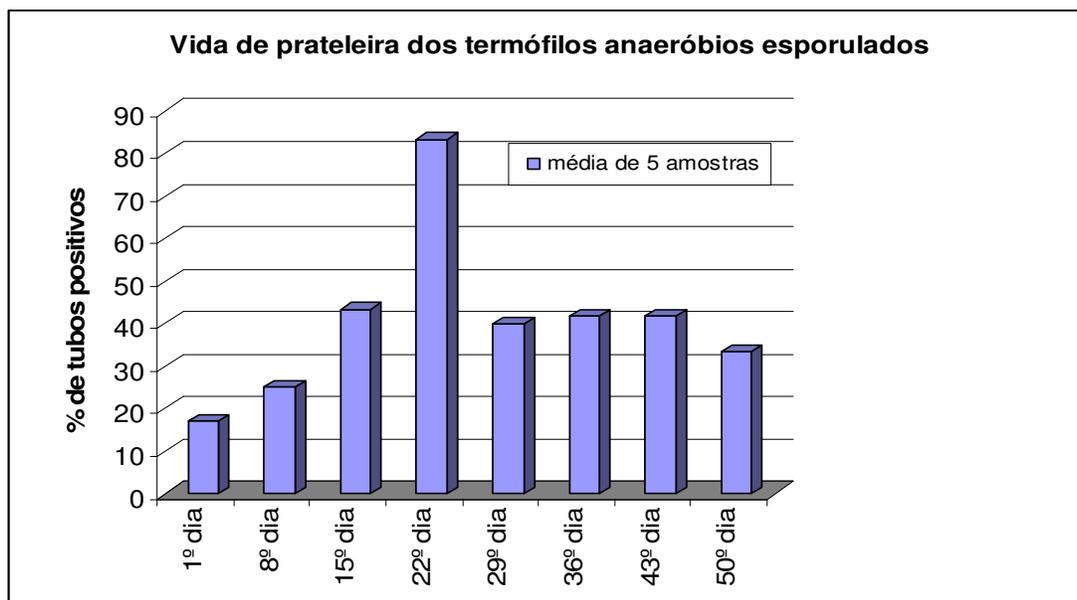


Figura 5.11: Evolução da média da população de termófilos anaeróbios esporulados em requeijão durante a vida de prateleira do requeijão.

Com relação aos microrganismos termófilos anaeróbios, observou-se que houve um aumento gradual da população esporulada até o 22º dia, onde a

contaminação chegou a atingir 83% de tubos positivos, isto pode ser explicado pela fase de adaptação do microrganismo termófilo frente a um ambiente de 4°C, bem com, pela pouca anaerobiose até o 22º dia, onde a esporulação apresentou um máximo considerável. Após este período, ocorre uma diminuição rápida e estabilização da contaminação de esporos nas semanas seguintes, sugerindo o início da esporulação tardia, que é efetivamente controlada pelas barreiras temperatura e concentração de sorbato neste caso.

Vale ressaltar que processamento térmico destas amostras reduziu a população de esporos que germinaram e/ou foram inviabilizados, sendo que o restante deles re-esporulou até 22º dia, mas após esta data possivelmente 50% desta população germinou podendo levar a deterioração do requeijão caso este estivesse exposto a temperaturas de abuso.

Como resultado global do acompanhamento da vida de prateleira é correto afirmar que até o 22º dia de estocagem os anaeróbios já entraram em esporulação devido à falta de condições ideais de reprodução, enquanto que os aeróbios estão metabolizando e consumindo o oxigênio residual do sistema. Após o 22º dia os aeróbios entram em esporulação deixando o ambiente reduzido para que os anaeróbios germinem, tardiamente, com possível produção de gás. Assim sendo, a flora mista de esporulados pode ser responsável pelo efeito combinado de deterioração. De maneira geral, entre o 1º e 8º dias mesófilos e termófilos aeróbios e mesófilos anaeróbios esporulados entraram em germinação sem alterar o pH do produto.

Como a deterioração física, resultante da possível germinação e/ou

crescimento pós-germinativo destes microrganismos, não foi detectada após o ensaio de vida de prateleira, as barreiras de temperatura a 4°C, bem como, a adição de sorbato de potássio, na formulação, estão sendo suficientes para manter o Produto Final sensorialmente estável até o 50º dia de estocagem. No entanto, considerando a alta carga esporulada, potencialmente deteriorante, se o requeijão for submetido a temperaturas de abuso de refrigeração nas gôndolas, de até 15°C, talvez a concentração de sorbato adicionada não seja suficiente para manter a qualidade do produto como originalmente processado e estes microrganismos tenham mais condições de germinar de se multiplicar e gerar metabólitos que alterem cor, textura e odor.

5.19. Número de microrganismos isolados durante a vida de prateleira do Requeijão Cremoso

A Tabela 5.18 apresenta o número de isolados referentes ao acompanhamento da vida de prateleira do Requeijão Cremoso. Neste caso, também foram isolados, no máximo, 3 colônias distintas para cada análise de microrganismos esporulados. Foi realizado o acompanhamento somente das amostras do lote 2 por ter sido o mais contaminado e apresentado maior diversidade microbiana.

Tabela 5.18 Número de isolados esporulados referentes ao acompanhamento da vida de prateleira do requeijão

Análise	1º Dia	8º Dia	15º Dia	22º Dia	29º Dia	36º Dia	43º Dia	50º Dia	TOTAL
Mesófilos Aeróbios	15	10	14	15	8	6	10	5	83
Termófilos Aeróbios	15	13	13	13	11	13	10	10	98
Mesófilos Anaeróbios	15	9	10	15	11	15	4	7	86
Termófilos Anaeróbios	3	6	12	15	9	2	2	9	58
TOTAL	48	38	49	58	39	36	26	31	325

Observa-se que o maior número de isolados foram provenientes do 1º do 15º e do 22º dia de estocagem do produto. Um total de 325 isolados foi obtido, sendo do grupo de termófilos aeróbios esporulados o que apresentou maior número de isolados.

5.20. Resultado da contagem das suspensões de esporos

A partir dos microrganismos isolados durante a vida de prateleira do Requeijão Cremoso, optou-se por determinar os microrganismos que sobreviveram ao processamento térmico aplicado ao produto em torno de 135°C, provenientes do 1º dia e do 22º dia de análise, uma vez que estas datas apresentaram maior número de isolados esporulados, (totalizando 48 isolados no 1º dia), e anaeróbios esporulados (totalizando 58 isolados 22º dia).

Para submeter estes microrganismos a diversos binômios seletivos foi necessário preparar diversas suspensões de esporos. Na Tabela 5.19 estão apresentadas as contagens obtidas das suspensões de esporos aeróbios estritos envolvendo mesófilos e termófilos isolados do primeiro e 22º dias de vida de prateleira.

Tabela 5.19. Resultados das contagens das suspensões de esporos aeróbios dos isolados do 1º e 22º dia de vida de prateleira.

Contagem esporo/mL	Número de suspensões
10^7	4
10^8	11
10^9	24
10^{10}	15
10^{11}	2
10^{12}	2

Dessa maneira, foram preparadas 58 suspensões de esporos dos isolados aeróbios estritos.

O método de esporulação utilizando apenas Agar Nutriente para os microrganismos aeróbios foi muito eficiente para produzir suspensões que variaram sua contagem de 10^7 a 10^{12} esporos/mL, onde 24 destas suspensões ficaram em torno de 10^9 esporos/mL, indicando que estes microrganismos têm facilidade em esporular até “in vitro”, podendo portanto, permanecer no produto nesta forma resistente e em situação

conveniente germinar e causando possível deterioração.

Na Tabela 5.20 estão apresentados os resultados das contagens das suspensões de microrganismos anaeróbios facultativos e estritos preparadas a partir dos isolados do 1 e 22º dia de vida de prateleira. Na esporulação dos microrganismos anaeróbios estritos e facultativos a produção dos lotes de esporos com concentrações altas foi bem mais difícil, sendo que a maioria deles apresentou contagem em torno de 10^5 esporos/mL. A maior dificuldade deste método está em conseguir um ambiente muito reduzido e ao mesmo tempo pobre que permita a esporulação destes microrganismos.

Tabela 5.20. Resultados das contagens das suspensões de esporos anaeróbios facultativos e estritos dos isolados das suspensões do 1 e 22º dia de vida de prateleira.

Contagem esporo/mL	Número de suspensões
10^2	1
10^3	13
10^4	12
10^5	16
10^6	3
10^7	1

Sendo assim, foram produzidas 48 suspensões envolvendo anaeróbios estritos e facultativos. Entretanto 2 delas foram inviabilizadas durante a manipulação.

Na Tabela 5.21 está apresentada a caracterização dos isolados anaeróbios facultativos e anaeróbios estritos, com relação ao teste de catalase, para caracterização dos mesmos como *Bacillus* ou *Clostridium*

Tabela 5.21 Caracterização dos isolados anaeróbios facultativos e anaeróbios estritos provenientes do dia 1 e 22º dia da vida de prateleira.

Caracterização	Número de isolados	Dia de isolamento	
		1º	22º
Mesófilos anaeróbios estritos	2	0	2
Mesófilos anaeróbios facultativos	26	15	11
Termófilos anaeróbios estritos	5	1	4
Termófilos anaeróbios facultativos	13	2	11

Pela tabela acima o número de isolados de mesófilos e termófilos esporulados anaeróbios estritos tende a aumentar com o incremento da vida de

prateleira. Também cabe ressaltar que os mesófilos anaeróbios facultativos constituem o maior grupo de isolados do 1º dia.

5.21. Resultado dos choques progressivos aplicados nos microrganismos aeróbios

Na Tabela 5.22 estão apresentados os resultados dos choques progressivos aplicados nos microrganismos esporulados aeróbios estritos, isolados do dia 1º e 22º dia da vida de prateleira. Estes choques foram aplicados com a finalidade de determinar quantos e quais eram os isolados mais termoresistentes e o seu binômio de sobrevivência.

Tabela 5.22 Choques progressivos nas suspensões de esporos de aeróbios

Binômio Tempo/temperatura	Número de isolados sobreviventes ao choque térmico
95°C/5 minutos	58
110°C/5 minutos	51
120°C/1 minuto	47
121°C/20 minutos	19
130°C/3 minutos	1

Pode-se observar que 100% dos isolados sobreviveram por 5 minutos a 95°C, confirmando sua resistência elevada. 51 isolados sobreviveram por 5 minutos a 110°C e apenas 1 isolado suportou ao tratamento aplicado durante 3 minutos a 130°C, sendo portanto este o microrganismo mais termoresistente entre os aeróbios estritos. Cabe salientar que este microrganismo foi isolado da amostra 17 do Produto Final, analisada no dia 22º de vida de prateleira, o qual apresentava pH 5,83, valor próximo ao valor do pH do Produto Final, sendo assim, sua resistência térmica pode estar adaptada às condições processamento. É importante ressaltar que, apesar de sua resistência, este microrganismo não deverá sobreviver ao processo térmico aplicado ao produto, que acontece a temperaturas mais elevadas. É, portanto se fez necessário procurar o alvo do processamento térmico entre os anaeróbios estritos e os anaeróbios facultativos.

Para reduzir o volume de trabalho os choques com os anaeróbios foram iniciados a partir do binômio 130°C/3minutos,tendo sobrevivido 100% dos isolados ,sendo assim foram aplicados os 133°C/3minutos seguido de 136°C/3, ´e 140°C/1´ para englobar a faixa de tratamento térmico comercialmente aplicado no produto, (vide a tabela 5.23)

5.22. Resultado dos choques progressivos nos microrganismos anaeróbios estritos e facultivos

Nas Tabela 5.23 e Tabela 5.24 estão apresentados os resultados dos choques seletivos para os isolados mesófilos e termófilos anaeróbios estritos e

facultativos. Cabe indicar que os isolados mesófilos tiveram um código numérico, já os isolados termófilos os códigos em letras.

O critério de sobrevivência foi produção de gás, acidificação e turbidez.

Tabela 5.23 Resultado dos choques progressivos nos microrganismos mesófilos anaeróbios estritos e facultativos

Número do Isolado	Catalase	Classificação do isolado	Choque 133°C/3min		Choque 136°C/3min		Choque 140°C/1min	
			Gás	Ácido	Gás	Ácido	Gás	Ácido
1	+	<i>Bacillus</i> sp (facultativo)	+	+	-	+	+	+
2	+	<i>Bacillus</i> sp (facultativo)	-	-	-	-	X	X
3	+	<i>Bacillus</i> sp (facultativo)	+	+	+	+	-	-
4	+	<i>Bacillus</i> sp (facultativo)	+	+	-	+	+	+
5	+	<i>Bacillus</i> sp (facultativo)	-	+	-	+	-	-
6	+	<i>Bacillus</i> sp (facultativo)	-	+	-	+	-	-
7	+	<i>Bacillus</i> sp (facultativo)	+	+	-	+	+	+
8	+	<i>Bacillus</i> sp (facultativo)	+	+	P	P	+	+
9	+	<i>Bacillus</i> sp (facultativo)	+	+	+	+	+	+
10	+	<i>Bacillus</i> sp (facultativo)	+	+	+	+	+	+
11	+	<i>Bacillus</i> sp (facultativo)	+	+	-	+	+	+
12	+	<i>Bacillus</i> sp (facultativo)	+	+	-	+	-	+
13	+	<i>Bacillus</i> sp (facultativo)	-	-	-	-	X	X
14	+	<i>Bacillus</i> sp (facultativo)	+	+	+	+	-	+
15	+	<i>Bacillus</i> sp (facultativo)	+	+	-	-	X	X
16	+	<i>Bacillus</i> sp (facultativo)	+	+	+	+	-	-
17	+	<i>Bacillus</i> sp (facultativo)	+	+	-	+	-	+
18	-	<i>Clostridium</i> sp	+	+	-	+	-	+
19	+	<i>Bacillus</i> sp (facultativo)	+	+	-	+	+	+
20	+	<i>Bacillus</i> sp (facultativo)	+	+	+	+	+	+
21	+	<i>Bacillus</i> sp (facultativo)	+	+	+	+	-	+
22	+	<i>Bacillus</i> sp (facultativo)	+	+	+++	++	+	+
23	-	<i>Clostridium</i> sp	+	+	++	+	+	+
25	+	<i>Bacillus</i> sp (facultativo)	+	+	-	+	-	+
26	+	<i>Bacillus</i> sp (facultativo)	+	+	+	+	+	+
28	+	<i>Bacillus</i> sp (facultativo)	+	+	++	++	+	+
29	+	<i>Bacillus</i> sp (facultativo)	-	-	-	-	X	X
30	+	<i>Bacillus</i> sp (facultativo)	+	+	+	+	+	+

Onde: (+) – CRESCIMENTO POSITIVO; (-) – CRESCIMENTO NEGATIVO; (X) CHOQUE NÃO APLICADO, P*: TUBO QUEBRADO.

Tabela 5.24 Resultado do choques progressivos nos microrganismos termófilos anaeróbios estritos e facultativos

Identificação do Isolado	Catalase	Classificação do isolado	Choque 133°C/3min		Choque 136°C/3min		Choque 140°C/1min	
			Gás	Ácido	Gás	Ácido	Gás	Ácido
A	-	<i>Clostridium</i> sp	+	+	+	+	+	+
B	+	<i>Bacillus</i> sp (facultativo)	+	+	+	+	+	+
C	+	<i>Bacillus</i> sp (facultativo)	-	+	+	+	+	+
D	+	<i>Bacillus</i> sp (facultativo)	+	+	-	+	+	+
E	-	<i>Clostridium</i> sp	+	+	+	+	-	-
F	+	<i>Bacillus</i> sp (facultativo)	-	-	-	-	X	X
G	+	<i>Bacillus</i> sp (facultativo)	-	+	-	-	X	X
H	-	<i>Clostridium</i> sp	-	-	-	-	X	X
I	+	<i>Bacillus</i> sp (facultativo)	-	+	+	(-) TURVO	+	+
J	+	<i>Bacillus</i> sp (facultativo)	-	+	+	+	-	-
K	+	<i>Bacillus</i> sp (facultativo)	-	+	+	+	+	+
L	+	<i>Bacillus</i> sp (facultativo)	-	+	+	+	+	+
M	-	<i>Clostridium</i> sp	+	+	+	+	+	+
N	+	<i>Bacillus</i> sp (facultativo)	-	+	+	(-) TURVO	+	+
O	+	<i>Bacillus</i> sp (facultativo)	+	+	-	-	X	X
P	-	<i>Clostridium</i> sp	-	+	-	+	+	+
Q	+	<i>Bacillus</i> sp (facultativo)	-	+	-	-	X	X
R	+	<i>Bacillus</i> sp (facultativo)	+	+	-	-	X	X

Onde: (+) – CRESCIMENTO POSITIVO; (-) – CRESCIMENTO NEGATIVO; (X) CHOQUE NÃO APLICADO

Tabela 5.25 apresenta os resultados dos choques progressivos nos microrganismos anaeróbios facultativos (*Bacillus*) e estritos (*Clostridium*) mesófilos e termófilos.

Tabela 5.25 Resultados dos isolados sobreviventes aos choques progressivos nos microrganismos anaeróbios facultativos e estritos

Binômio Tempo/temperatura	Número de isolados anaeróbios facultativos esporulados ao choque térmico (<i>Bacillus</i>)		Número de isolados anaeróbios estritos esporulados ao choque térmico (<i>Clostridium</i>)	
	Mesófilos	Termófilos	Mesófilos	Termófilos
130º/ 3 minutos	26	13	2	5
133ºC/3minutos	23	12	2	4
136ºC/3 minutos	21	8	2	4
140ºC/1minutos	18	7	2	3

Pode-se observar que de um total de 46 cepas, 18 mesófilas anaeróbias facultativas, 2 mesófilas anaeróbias estritas, 7 termófilas anaeróbias facultativas, 3 termófilas anaeróbias estritas sobreviveram ao choque 140ºC/1´minutos, sendo potencialmente capazes de deteriorar o produto. Portanto o grupo mais resistente foram os *Bacillus* mesófilos facultativos.

É sugerido realizar testes completos para verificação do potencial deteriorante destas culturas inoculando-as diretamente no produto estéril e incubando nas temperaturas de abuso para observação do defeito. Sugere-se ainda a aplicação de choques com binômios mais agressivos para se definir o (s) isolado (s) mais termoresistente (s). Entretanto a aplicação de novos choques em temperaturas maiores que 140ºC requerem tempos muito curtos e pelo fato de que o atraso térmico se torna

muito maior que o próprio tempo de choque, torna-se impreciso o controle do tempo seguindo esta metodologia.

5.23. Caracterização dos isolados sobreviventes ao choque térmico 140^o/1´

Para verificação da capacidade deteriorante destes microrganismo no produto foi feita a inoculação em 2 meios, PE-2 e Litmus Milk, os resultados estados na tabela 5.26. Os isolados estão agrupados por comportamento similares, permitindo inferir que muitos deles são possivelmente membros de determinada (s) espécie (s), precisando, no entanto, de ensaios confirmatórios de identificação.

A Tabela 5.26 apresenta a descrição macroscópica e microscópica dos isolados inoculados em meio PE-2. Cabe indicar que os isolados mesófilos tiveram um código numérico, já os isolados termófilos os códigos em letras

Tabela 5.26: Caracterização dos isolados, sobreviventes ao choque térmico 140°C/1'.

Grupos	Característica deterioração no meio PE-2	Isolados	Morfologia Microscópica	Característica deterioração no meio Litmus Milk	
Grupo 1	Muita produção de gás, muita digestão da ervilha (amarela), sem turbidez, meio translúcido	Catalase + 1, 4, 7, 8, 9, 10, 11, 14, 19, 20, 21.2, 30.2. B, C, D, P.	G+, bastonetes médios finos, arranjo pelos extremos cadeias compridas, endósporo terminal, levemente intumescido esféricos	Coagulação Fermentação Tormentosa Hidrolise da caseína Produção de Gás Redução do Litmus	
		Catalase - 23			
		Catalase+ 26, 22, 21.1, 30.1	G+, bastonete curto em grupos ou isolados, endósporos esféricos		
Grupo 2	Pouca produção de gás, digestão da ervilha (verde), muita turbidez, meio opaco.	Catalase+ 12, 17, 18,	Bastonete G+, Isolados, curtos, endosporo terminal e esférico, grossos, arranjo irregular ou isolados.	Coagulação Fermentação Tormentosa Hidrolise da caseína Produção de Gás Redução do Litmus	
		Catalase - 28.			
		Catalase +25.	G+, bastonetes médios finos, arranjo pelo extremos cadeias compridas, endosporo terminal, levemente intumescido esféricos		
		Catalase+, I, K,	Bastonete G+, curto, parede grossa, em grupos irregulares ou isolados, endosporo esférico.		Hidrolise caseína Não formação de gás Liberação de soro
		, Catalase-, M			
		Catalase + L, N,	Bastonete G+, curto, parede grossa, em grupos irregulares ou isolados, endosporo esférico.		Coagulação Fermentação Tormentosa Hidrolise da caseína Produção de Gás Redução do Litmus
		Catalase - A			

Onde: Mesófilos: Números; Termófilos: Letra

Esta classificação não é conclusiva, e serve apenas para agrupar os isolados

de acordo com as suas características morfológicas e microscópicas sendo necessário outros testes bioquímicos confirmatórios para concluir sua identidade.

No entanto, a inoculação em Litmus milk indica que a grande maioria hidrolisou a caseína com 75% dos isolados produzindo fermentação tormentosa, portanto na sobrevivência podem degradar o produto, com sua atividade proteolítica e sacarolítica e de alta produção de gás, comportamento também confirmado no meio PE-2.

6. CONCLUSÃO

De maneira geral o ingrediente mais contaminado do requeijão por esporulados mesófilos termófilos anaeróbios e aeróbios foi o Concentrado Protéico, seguido pela Massa Petit Swiss ambos os lotes. Os ingredientes menos contaminados foram o Citrato de Sódio e a Água. A carga microbiana dos ingredientes se arrasta até o Produto de Linha antes do processamento UHT não sendo totalmente eliminada pelo tratamento térmico aplicado ao produto.

O perfil da contaminação do lote 2 foi significativamente diferente do lote 1, porém os mesófilos e termófilos anaeróbios e aeróbios tiveram contagens mais altas nas amostras do lote 2 em relação ao lote 1. Isto ocorreu em função da estação mais quente do ano em que o lote 2 foi produzido, selecionando a flora esporulada do ambiente e contaminando os ingredientes, principalmente o Concentrado Protéico atingindo o Produto de Linha e o Produto Final. Houve, portanto, um efeito sazonal das altas temperaturas do verão.

Não houve contaminação pelos patogênicos *L. monocytogenes*, *E. coli*, *S. aureus* coagulase e DNase positiva e *C. perfringens* durante os 50 dias de acompanhamento da vida de prateleira do requeijão cremoso, nem no Produto Final de ambos os lotes analisados, indicando que o produto atende as exigências do Mercosul RES n. 82, (1996) e regulamentação ANVISA (2001) .

A incubação a 4°C, durante 50 dias, não permitiu a observação de nenhuma

deterioração aparente como alteração de odor, textura, cor, separação de fase, granulação e/ou estufamento, se mostrando como condição ideal para manutenção do requeijão durante a vida de prateleira. No entanto, foi observado um incremento na população de esporos anaeróbios termófilos até o 22º dia, seguido de posterior decréscimo e possível germinação. Este incremento também foi observado aos 15 dias para os mesófilos anaeróbios esporulados, enquanto que a população de mesófilos aeróbios esporulados decrescia até o 15º dia. A tendência no final da vida de prateleira é de estabilização das populações de esporos, em torno de $1,00E+02$ esporos/g.

Os *Bacillus* anaeróbios facultativos apresentaram maior número de isolados nos dias 1º e 22º dias de vida de prateleira. A maioria dos sobreviventes ao choque $140^{\circ}\text{C}/1\text{min}$ tem capacidade de deteriorar produtos de base Láctea como o requeijão pois podem coagular, causar proteólise e hidrolisar a caseína com liberação de gás. Devido a extrema resistência destes organismos sua eliminação pelo tratamento térmico é insuficiente podendo afetar a qualidade do produto.

Houve predominância dos mesófilos anaeróbios facultativos como o grupo mais termoresistente sobrevivendo a choque térmico de $140^{\circ}\text{C}/1\text{minuto}$. O segundo grupo de importância foi o dos mesófilos e termófilos anaeróbios estritos.

O processo térmico aplicado a este produto, apesar de ser rigoroso, não está desenhado para eliminar a alta carga, não esperada, dos contaminantes esporulados. Devendo, portanto o binômio tempo temperatura ser redimensionado considerando como base a carga inicial contaminante do Produto de Linha do lote 2. Além do processamento UHT estar sub dimensionado foi observado o incremento de 1 ciclo log

na população esporulada mesófila aeróbia, do Produto Final processado do lote 2. Assim sendo, medidas corretivas devem ser aplicadas em relação aos aspectos higiênico-sanitários das superfícies e do ambiente que entram em contato com o Produto Final, desde a saída dos trocadores de calor até o final do envase (resfriamento).

A manutenção do produto a 4°C e a possível ação do sorbato assegura sua estabilidade microbiologia e sensorial de 50 dias nestas condições, no entanto, devido a alta carga de esporulados o produto não deve ser submetido a condições de abuso de temperatura que levaria a sua deterioração e estufamento.

7. BIBLIOGRAFIA

ALMEIDA, P. F.; ALMEIDA, R. C. C., RODRICK, G. E. *Listeria monocytogenes*: importância e distribuição nos alimentos, **Higiene Alimentar**, v. 13, n. 61, p. 19-23, set, 1999.

ALLOUANE, R.G.; BROUSSOLLE, V.; CARLIN, F. Influence of the sporulation temperature on the impact of nutrients inosine and L-alanine on *Bacillus cereus* spore germination. **Journal of Food Microbiology**, 2007. In press

ANDERSON, A., RÖNNER, U., GRANUM, P. E. What does the food industry have with the spore-forming pathogens *Bacillus cereus* and *Clostridium perfringens*?. **International Journal of food Microbiology**, v. 28, p. 145-155, 1995.

APHA – American Public Health Association, Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods, 4th Edition, Washington, DC, 2001, 676p.

ASH, C., F. G., PRIEST, M.D. COLLINS . Molecular identification of rRNA group 3 bacilli using a PCR probe test proposal for the creation of a new genus *Paenibacillus*. **Antonie Van Leeuwenhoek**, v. 64, p.253-260, 1994.

BAGLIONI, F. **Estudo da ocorrência de fungos filamentosos termorresistentes em polpa de tomate envasada assepticamente**, 94 p. Dissertação (Mestrado em Ciências de Alimentos), Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 1998.

BASKARAN, S. ; HOGSETT, D. ; LYND, L.R. Optimization of chemically defined, minimal medium for *Clostridium thermosaccharolyticum*. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 51, p.339-411.1995.

BERGERÈ, J. L.; HERMIER, J. Spore Proprieties of Clostridia Occurring in Cheese. **Journal Applied Bacteriology**, v. 33, p. 167-179, 1970.

BIOMÉRIEUX, Brasil, 2003. Kit MINI VIDAS *Listeria monocytogenes* LMOII Ref. 30704 – AFNOR(No. Bio – 12-9-07/02) e NORDVAL (No. 2003-20-54-0009).

BRASIL, Ministério da agricultura e do Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. Departamento de Inspeção de Produtos de origem Animal. Regulamentos Técnicos de Identidade e Qualidade de Leite e Produtos Lácteos. Portaria nº 356. **Regulamento Técnico para Fixação de Identidade e Qualidade de queijo processado ou fundido, processado. Pasteurizado ou fundido UHT (UAT)**. Brasília, 1997.

BRASIL, Ministério da saúde, Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), Resolução – RDC nº12, de 2 de Janeiro de 2001, Regulamento Técnico sobre os padrões microbiológicos para alimentos.

BROCKLEHURST, T. F.; LUND, B.M. The effect of pH on the initiation of growth of cottage cheese spoilage bacteria, **International Journal of Food Microbiology**, v. 6, pg. 43-49, 1988.

CARVALHO FILHO, C. D. **Utilização do bioteste com esporos de Bacillus subtilis na avaliação da integridade asséptica de embalagens flexíveis**

esterilizáveis. Tese (Mestrado em Ciencia de Alimentos). Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 1996.

CASAROTTI, V. T.; GALLO, C. R.; CAMARGO, R.; Ocorrência de *Listeria monocytogenes* em leite cru leite pasteurizado tipo C e queijo minas frescal comercializados em Piracicaba – SP. **Archivos Latinoamericanos de Nutricion**, v. 44, n. 3, p. 158-163, 1994.

COCOLIN, L., INNOCENT, N., BIASUTTI, M., COMI, G. The late blowing in cheese: a new molecular approach based on PCR and DGGE to study the microbial ecology of the alteration process. **International Journal of Food Microbiology**, v. 90, p. 83-91, 2003.

DESTRO, M. T.; SERRNO, A. M.; KABUKI, D.Y.; Isolation of *Listeria* species from some Brazilian met and dairy products. **Food control**, p. 110 – 112, abr, 1991.

DEAK, T.; TIMÁR, E. Simplified identification of aerobic spore-formers in investigation of foods. **International Journal of Food Microbiology**, v. 6, p. 115-125, 1988.

DOWNES, F.P.; ITO, K. Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods. 4th edition. Washington DC. APHA. 2001.

DROBNIIEWSKI, F. *Bacillus cereus* and related species. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 6, p. 324-338, 1993.

DUNCAN, C. L., STRONG, D. H. Improved medium for sporulating of *Clostridium perfringens*. **Applied Microbiology**, v. 16, n. 1 p. 82-89, 1968.

EVANCHO, G. M. ; WALLS, I. Aciduric Flat Sour Sporeformers. In: APHA – American Public Health Association. Compendium of methods for the microbiological examination of foods. 4a ed. Cap. 24. Washigton, DC. 2001

FDA – FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. Bacteriological Analytical manual. 8th edition. Revision A, Chapter 14, 1998.

GARRUTI, D. S.; BRITO, E. S.; BRANDÃO, T.M.; UCHÔA, P.; SILVA, M. A. A. P.; Desenvolvimento do perfil sensorial e aceitação de requeijão cremoso. **Revista Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.03, n. 3, 2003.

GIGANTE, M. L. **Requeijão cremoso obtido por ultrafiltração de leite pré-acidificado adicionado de concentrado protéico de soro**. Tese (Doutorado em Tecnologia de Alimentos). Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 1998.

GORDON, R.E., SMITH, N.R. Aerobic sporeforming bacteria capable of growth at high temperatures. **Journal of Bacteriology**, n. 58, p. 327, 1949.

GRANUN, P. E. *Bacillus cereus* and its toxins. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 76, p. 61-66, 1994.

HAMMER, P.; LEMBCKE, F. ; SUHREN, G. ; HEESCHEN, W. Characterization of heat resistant mesophilic *Bacillus* species affecting quality of UHT milk – A preliminary report. Kiel. Milchwirtsch. Forschungsber, v. 47, p. 303-311. 1995.

HOLDEMAN, L.V.; CATO, E. P.; MOORE, W. E. C. Anaerobe Laboratory Virginia Polytechnic Institute and State University Blacksburg. **Anaerobe Laboratory**

Manual, 4 th Edition, Blacksburg, Virginia, 1997.

HOFFMANN, F. L.; PENNA, A. L. B.; MANSOR, A. P.; COELHO, A.R.; VINTURIM, T.M. **Estudo da qualidade do reuqueijão cremoso**. Indústria de Laticínios, mar/abr, 2001.

HUEMER, I. ; KLIJN, N. ; VOGELSANG, H. ; LANGEVELD, L. Thermal death kinetic of spores of *Bacillus sporothermodurans* isolated from UHT milk. **Internation Dairy Journal**, v.8, p.851-855, 1998.

HICKEY, C.S.; JOHNSON, M. G. Effects of pH shifts, bile salts, and glucose on sporulation of *Clostridium perfringens* NCTC 8798. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 41, n. 1, p. 124-129, Jan, 1981.

HSU, E., ORDAL, Z.J.Sporulation of *Clostridium thermosaccharolyticum* under conditions of restricted growth. **Journal of Bacteriology**, v. 97, n. 3, p. 1511-1512,1969.

HSU, E., ORDAL, Z.J.Sporulation of *Clostridium thermosaccharolyticum*. **Applied Microbiology**, v. 18, p. 958-960,1969.

HUCHET, V.; THUAULT, D. BOURGEOIS, C.M. The stereoselectivity of the use of lactic acid by *Clostridium tyrobutyricum*. **Food Microbiology**, v. 14, p. 227-230, 1997.

JAY, J. M. **Modern Food Microbiology**. 4th ed. New York: Van Nostrand Reinhold, 1992.

JOHNSON, K. M.; NELSON, C. L.; BUSTA, F. F. Germination and heat resistance of *Bacillus cereus* spores from strains associated with diarrheal and emetic food-borne illness. **Journal of Food Science**, v. 47, p. 1268-1271, 1982.

KASTANAS, P.; RAVANIS, S.; LEWIS, M. J.; GRANDESON, A. S. Effects of raw milk quality on fouling as UHT conditions. **Journal Soc. Dairy Technol.**, v. 48, n. 3, p. 97-99, 1995.

KAUTTER, D.A.; LILLY, T.; LYNT, R.K.; SOLOMON, H. M. Toxin production by *Clostridium botulinum* in shelf-stable pasteurized process cheese spreads, Washington, DC, **Journal of Food Protection**, v. 42, n. 10, p. 784-786, jan. 1979.

KRAMER, A; DOUGLASS, L. W.; BENDER, F. E. **Statistical methods for food & agriculture**, AVI Publishing Company Westport, U.S.A, 1982 , 338p.

KRAMER, J. M.; GILBERT, R. T. *Bacillus cereus* and other *Bacillus* species. In: M.P. Doyle(editos), **Foodborne Bacterial Pathogens**, Marcel Decker, N.Y., p. 21-70, 1989.

LANCETTE, G. A., BENNETT, R.W. *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcal Enterotoxins*. In: APHA – American Public Health Association. Compendium of methods for the microbiological examination of foods. 4a ed. Cap. 39. Washigton, DC. 2001

LABBE, R. G.; DUNCAN, C.L. **Sporulation and enterotoxin production by *Clostridium perfringens* Type A under conditions of controlled pH and temperature**. Canadian Journal Microbiology, v. 20, p. 1493-1502, 1974

LAKE, D. E.; GRAVES, R. R.; LESNIEWSKI, R. S.; ANDERSON, J. E. Post-processing of low-acid canned foods by mesophilic anaerobic sporeformers. **Journal of Food Protection**, v. 48, n. 3, p. 221-226, 1985.

LEUSCHNER, R. G. K., LILLFORD, P.J. Effects of temperature and heat activation on germination of individual spores of *Bacillus subtilis*. **Applied Microbiology**, vol. 29, pg. 228-232, 1999.

LOESSNER, M.J., MAIER, S. K. SCHIWEK, P., SCHERER, S. Long-chain polyphosphatates inhibit growth of *Clostridium tyrobutyricum* in processed cheese spreads. **Journal of Food Protection**, v. 60, n. 5, p. 493-498, 1997.

LONCAREVIC, S.; THAM, M. D.; THAM, W. Occurrence of *Listeria monocytogenes* in soft and semi-soft cheeses in retail outlets in Sweden, **International Journal of Food Microbiology**, v. 26, p. 254-250, 1995.

MATIJASIC, B.B., RAJSP, M.K.; PERKO, B.; ROGELJ, I. Inhibition of *Clostridium tyrobutyricum* in cheese by *Lactobacillus gasseri*. **International Dairy Journal**, v. 17, p. 157-166, 2006.

MASSAGUER, P. R. **Microbiologia dos Processos Alimentares**. São Paulo, Editora Varela 2005, p. 258.

MCKINNON, C. H.; PETTIPHER, G. L. A survey of sources of heat-resistant bacteria in milk particular reference to psychrotrophic spore – forming bacteria. **Journal of Food Science Technology**, v.50, n.2, p. 163 – 170, 1983.

Mercosul/ GMC/ RESOLUÇÃO n. 82, **Regulamento técnico mercosul de**

identidade e qualidade do requeijão, 1996.

MOIR, A.; Bacterial spore germination and protein mobility. **TRENDS Microbiology**, vol. 11, n. 10, pg. 452-454, 2003.

MORENO, I.; VIALTA, A. Queijos processados: qualidade microbiológica das matérias-primas e do Produto Final, In: **Requeijão cremoso e outros queijos fundidos, aspectos de qualidade, processamento, rotulagem, legislação e mercado**, Campinas:ITAL, cap. 6,p. 245, 2000.

MORENO, I.; VIALTA, A.; VALLE, J. L. E. Efeito das várias etapas de processamento de requeijão e queijos fundidos na microbiota do leite. **Revista Industria de Laticínios**, v. 7, , n. 38, p. 63-68. mar/abr, 2002^a.

MORENO, I., VIALTA, A., VALLE, J. L. E. Microrganismos responsáveis pelas principais deteriorações do requeijão e outros queijos fundidos, **Revista Industria de Laticínios**, v. 7, n. 41, p. 72-75, Set/out, 2002^b.

MOSSEL, D.D., CORRY, J.E.L.;SRTUIJK, C.B., BAIRD, R.M. **Essentials of the microbiology of foods** – A textbook for advanced studies, John Wiley & Sons Ltd. Chicester, UD, 1995, 699.

OLSON, K.E. ; SORRELLS, K.M. Thermophilic Flat Sour sporeformers. In: APHA – American Public Health Association. Compendium of methods for the microbiological examination of foods. 4a ed. Cap. 25. Washigton, DC. 2001.

PACHECO, C. P. **Validação do processo de esterilização para polpa de tomate em unidade UHT**, 154 p. Tese (Mestrado em Ciências de Alimentos),

Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2001.

PACHECO-SANCHEZ, C. P. **Ocorrência de *Bacillus cereus*, avaliação de sua resistência térmica em sistema contnuo e seu controle em leite UHT**, 231p. Tese (Doutorado em Ciências de Alimentos), Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2005.

PARRY, J.M.; GILBERT, R. J. Studies on the heat resistance of *Bacillus cereus* spores and groth of the organism in boiled rice. **Journal of Hygiene – Cambridge**, p. 77-84, 1980.

PETTERSSON, B.; LEMBKE, F.; HAMMER,P.;STACKENBRANDT,E.; PRIEST, F.G. *Baccillus sporothermodurans*, a new specie produding highly heat-reistent endospores, **International Journal of Systematic bacteriology**, v. 46, n. 3, p. 759-764, Jul, 1996.

PHEIL, C.G.; ORDAL, Z.J. Sporulation of the thermophilic anaerobes. **Applied microbiology**, v.15, p.893-898, 1967.

PFLUG, I. J.; **Microbiology and engineering of sterilization processes**, 10th Edition, Minnesota, Enviromental Sterilization Laboratory, cp. 4, p.1-29, 1991.

PREVOT, A. R. **Manual for the classification and determination of the anaerobic bacteria**, American Edition, Montreal, 1965.

RAMSARAN, H.; CHEN, J.; BRUNKE.B.;HILL, A.;GRIFFITHS, N.W. Survival of bioluminescent *Listeria monocutogenes* and *Escherichia coli* 0157-H7 in soft chesses.

Journal of Dairy Science, v. 81, p. 1810-1817, 1998.

RAPACCI, M.; VAN DENDER, A. G. F. Qualidade da matéria-prima e cuidados nos processamentos de requeijão cremoso e queijos fundidos, **Revista Leite e Derivados**, n. 37, v. 8, p. 18-26, nov/dez, 1997.

REED, J. M.; BOHRER, C. W.; CAMERON, E. J.; Spores destruction rate studies on organisms of significance in the processing of canned food. **Journal of Food Research**, v. 16, n. 5, p. 383-408, 1951.

Requeijão: Nome é a principal diferença. **Pró- Teste**, vol. 39, pag. 14-19, 2005

RICHMOND, B.; FIELDS, M. L. Distribution of thermophilic aerobic sporofforming bacteria in food ingredients. **Applied Microbiology**, v. 14, n. 4, p. 623-626, jul, 1966.

RITCHER, R.L.; VEDAMUTHU, E.R. Milk and milk products. In: APHA – American Public Health Association. Compendium of methods for the microbiological examination of foods. 4a ed. Cap. 47. Washigton, DC. 2001.

ROGGA, K. J.; SAMELIS,; J. KAKOURI, A.; KATSIARI, M. C.; SAVVAIDIS, I. N.; KONTOMINAS, M. G.; Survival of *Listeria monocytogenes* in Galotyri, a tradicional Greek soft-cheese, stored aerobically at 4°C and 12°C. **International Dairy Journal**, v. 15, p. 59-67, 2005.

RUSUL,G. & YAACOB, N. H. Prevalence of *Bacillus cereus* in selected foods and of enterotoxin usin TECRA-VIA and BCET-RPLA. **International Journal of Food**

Microbiology, v. 25, n. 2, p. 131-139, 1995.

RYSER, E.T., DONNELLY, C.W. *Listeria*. In: APHA – American Public Health Association. Compendium of methods for the microbiological examination of foods. 4a ed. Cap. 36. Washigton, DC. 2001.

SANTOS, J. A. Requeijão: produto típico do Brasil com mercado emergente. **Revista Leite e Derivados**, n. 66, p. 36 – 46, set/out, 2002.

SCOTT, V.N.; ANDERSON, J.E.; WANG, G. Mesophilic Anaerobic Soreformes. In: APHA – American Public Health Association. Compendium of methods for the microbiological examination of foods. 4a ed. Cap. 23. Washigton, DC. 2001.

SCHMITT, A. DÚR, J. W.; SOARES, J. Contagem de mssófilos e de psicrotróficos em leite cru de diferentes regiões do Rio Grande do Sul. In: **Congresso Latino-Americano de Higienistas de Alimentos**, 1º Congresso Brasileiro de Higienistas de Alimentos, Resumos, Belo Horizonte, MG, 181pg, 181.

SEGNER, W. P. Mesophilic aerobic sporeforming bacteria in the spoilage of low – acid canned foods. **Food Technology**, p. 55-59, jan, 1979.

SNEATH, P. H.A.; MAIR, N. S.; SHARPE, M.E.; HOLT, J. G. In: **Bergey's Manual Systematic Bacteriology**, vol.2, Williams & Wilkins, Baltimore, U.S.A, 1986, 1599 p.

SETLOW, P.; Spore germination. **Current Opinion in Microbiology**, vol. 6, pg. 550-556, 2003, 1965

SILVA, M. C. D.; VILARDI, T. C. C.; TIBANA, A.; Avaliação de métodos para a detecção de *Listeria* em queijos. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 18, n. 2, mai/jun, 1998.

SMITH, N. R.; GORDON, R. E.; CLARK F.E. Aerobic mesophilic sporeforming bactéria, **U.S. Department of Agriculture**, Washington, DC., 1946.

STADHOUDERS, J., Taxonomy of *Bacillus cereus*. **Bull. International Dairy Federation**, n. 275, p. 4 – 8, 1992.

STUMBO, C.R. **Thermobacteriology in Food Processing**, Academic Press, London, 1965,236 p.

TANAKA, N.; GOEPFERT, J. M.; TRAISMAN, E.; HOFFBECK, W. A challenge of pasteurized process cheese spread with *Clostridium botulinum* spores, **Journal of Food Protection**, v. 42, n. 10, p. 787-789, 1979.

TANIWAKI, M.H.; HOCKING, A.D.; PITT, J. I., FLEET, G. H. Growth of fungi and mycotoxin production on cheese under modified atmospheres, **International Journal of Food Microbiology**, v. 68, p. 125-133, 2001.

THOMPSON, P.J. Thermophilic organisms involved in food spoilage: Aciduric flat Sour sporofforming aerobes. **Journal of Food Protection**, n. 44, p. 154.

VAN DENDER, A. G. F. Fabricação de queijos fundidos e de requeijão cremoso: Aspectos legais e Parâmetros para a escolha da matéria prima, **Revista Indústria de laticínios**, n.35, v. 6, p. 62-65, set/out, 2001.

VAN DENDER, A. G. F. Fabricação de queijos fundidos e de requeijão cremoso: Princípios básicos, definição, tipos e aspectos legais, **Revista Industria Laticínios**, nov, 2002.

VAN DENDER, A. G. F. **Requeijão cremoso e outros queijos fundidos: Tecnologia de fabricação, controle do processo e aspectos de mercado**. São Paulo, Fonte Comunicações e Editora Ltda, 2006, 391p.

VARGAS, O. L. Termo-estabilidade de alguns sistemas proteolíticos extracelulares produzidos por bactérias psicrófilas. **Revista Instituto Laticínios Candido Tostes**, pg. 20, mai/jun, 1979.

VIALTA, A., MORENO, I., VALLE, J. L. E. Boas Práticas de Fabricação, Higienização e Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle na Indústria de Laticínios, **Revista Industria de Laticínios**, v. 6, n. 37, p. 56-63, jan/fev, 2002.

VIEIRA, M.A.S. **controle de *Listeria monocytogenes* Scott A em queijos minas frescal através de tratamento termoquímico**. Tese (Doutorado em Ciência de Alimentos). Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2000.

Von BOCKELMANN, B **Aseptic packing processing**. Tetra Pack International. 1982.

WARBURTON, D., W.; PETERKIN, P. I., WEISS, K., WEISS, K, F., A survey of the microbiological quality of Processed Cheese Products, **Journal of Food Protection**, v. 49, n. 3, p. 229-230, mar, 1986.

ZEIGLER, D.R. *Bacillus Genetic Stock Center Catalog of stains*, vol. 3:
The genus *Geobacillus*, 7th Edition, Ohio, 2001.

Sites:

(www.datamak.com.br), (2004)

8. APÊNDICE

TGE (Tryptona Glucose Extrato de Carne Agar): pH final 7,0 composição por litro
(APHA, 2001).

- Extrato de carne: 3g
- Tryptona: 5g
- Dextrose: 1g
- Agar: 15 g
- Água 1 litro

Autoclavar 15 minutos / 121°C

Caldo PE-2 (Meio de Ervilha) (APHA, 2001).

- Extrato de levedura: 3g / 1 litro - 0,36g / 120ml
- Peptona: 20 g / 1 litro - 2,4g / 120ml
- Bromocresol Púrpura: 2 ml de uma solução 2% em etanol / 1 litro -
0,24ml de uma solução 2% em etanol / 120 ml

Distribuir 19-20 ml por tubo adicionando 8-10 ervilhas secas desidratadas por tubo. Deixar em descanso para rehidratação por 40 minutos antes de autoclavar 15 / 121°C.

Dextrose Triptona Bromocresol Agar (DTA): ph final 6,7 (**APHA, 2001**).

- Triptona: 10 g / 1 litro
- Dextrose: 5 g / 1 litro
- Agar: 15 g / litro
- Bromocresol purpura: 0,04g

Misturar em agua destilada, ferver ate completa dissolucao do agar.
Esterilizar a 121°C / 15 minutos. Distribuir 20 ml por placa estéril.

▪ **LST (Lauryl Tryptose Broth) (Difco):**

- Tryptose Peptona: 20,0g
- Lactose: 5,0g
- Dipotassium Phosphate: 2,75g
- Monopotassium Phosphate: 2,75g

Dissolver 35,6g / Litro. Esterilizar a 121°C / 15 minutos.

▪ **Brilhant Green Bile pH final 7,2 (DIFCO – 274000)**

- Peptone 10,0g
- Oxall 20,0g
- Lactose 10,0g
- Brillhant Green 0,0133g

Dissolver 40 g / Litro. Esterilizar a 121°C / 15 minutos.

- **EC medium pH 6,9 (DIFCO - 231430)**

- Digerido Pancreatico Caseína 12,0g
- Proteose Peptona 8,0g
- Lactose 5,0g
- Sais de Bile 1,5g
- Fosfato dipotássico 4,0g
- Fosfato monopotássico 1,5g
- Cloreto de Sódio 5,0g

Disolver 37g / Litro. Esterilizar a 121°C / 15 minutos.

- **Baird-Parker Agar Base (OXOID – CM 0275)**

- Triptona 10,0g
- Lab-lemco 5,0
- Extrato de levedura 1,0
- Piuvato de sódio 10,0
- Glicina 12,0
- Cloridrato de Lítio 5,0
- Agar 20,0

Dissolver 63g / Litro. Esterilizar a 121°C / 15 minutos. Esfriar a 50°C e adicionar 5 % de solução gema de ovo, e 1% de solução telurito.

- **Brain Heart Infusion pH final 7,4 (DIFCO 237500)**

- Cérebro de Bezero 7,7g
- Coração Bovino 9,8g
- Proteose Peptona 10,0
- Dextrose 2,0g
- Cloreto de Sódio 5,0g
- Fosfato dissodico 2,5g

Dissolver 37g / Litro. Esterilizar a 121°C / 15 minutos.

- **Meio DNA-azul de toluidina: 5 ml**

- Cloreto de Sódio – 10g
- TRIS (hidroximetilaminometano) – 6,1g
- DNA (Ac. Desoxirribomucleico) – 0,3g
- Azul de o-toluidina (8,3 ml da solução aquosa 1%) – 0,083g
- Cloreto de Cálcio Anidro (5,5 ml da solução aquosa 0,1%) –
0,0055g
- Agar – 10g
- Água destilada 1 Litro

Dissolver 6,1g do Tris em 1 Litro de água destilada e ajustar o pH em 9,0. Adicionar os demais ingredientes, exceto o azul de o-toluidina, dissolver e aquecer até completa fusão do agar. Preparar uma solução aquosa 1% do azul de o-toluidina e

adicionar 8,3 ml acada litro de meio previamente fundido e esfriado a 45-50°C, misturando bem. Distribuir em frascos com 50-100 ml e estocar a temperatura ambiente por ate 4 meses, com as tampas bem rosqueadas para evitar a evaporação. Não eh necessário esterilizar e pode ser utilizado mesmo após varias etapas de fusão (sempre em Banho Maria).

▪ **Caldo Tioglicolato pH final 7,1 (DIFCO – 225650)**

- Digerido Pancreatico Caseína 15,0g
- Extrato de Levedura 5,0
- Dextrose 5,5g
- Cloreto de Sódio 2,5g
- L-cisteína 0,5g
- Tioglicolato de Sódio 0,5g
- Agar 0,75g
- Resazurina 0,001g

Disolver 29,8g / Litro. Esterilizar a 121°C / 15 minutos.

▪ **Meio motilidade – nitrato: 80 ml**

- Extrato de carne – 3,0g / 1 Litro – 0,24g / 80ml
- Peptona – 5,0g / 1 Litro – 0,4g / 80ml
- Nitrato de potássio – 1,0g / 1 Litro – 0,08g / 80ml
- Galactose – 5,0g / 1 Litro - 0,4g / 80ml
- Glicerol – 5,0g / 1 Litro – 0,4g / 80ml
- Fosfato dissodico – 2,5g / 1 Litro - 0,2g / 80ml
- Agar – 3,0g / 1 Litro - 0,24g / 80ml

Dissolver os ingredientes, exceto o agar, em água destilada. Ajustar o pH a 7,4. Adicionar o agar e ferver até completa fusão. Distribuir 11 ml por tubo de rosca 16x150mm e autoclavar a 121°C / 15 minutos. Caso o meio não seja utilizado em 4 horas após preparado, aquecer em água fervente durante 10 minutos.

▪ **Meio lactose gelatina – 80 ml**

- Triptose – 15g / 1 Litro – 1,2g / 80ml
- Extrato de levedura – 10g / 1 Litro – 0,8g / 80ml
- Lactose – 10g / 1 Litro – 0,8g / 80ml
- Vermelho de fenol –
- Gelatina – 120g / 1 Litro – 9,6g / 80ml

Suspender os ingredientes exceto a gelatina e o vermelho de fenol em 32 ml de água destilada. Dissolver a gelatina em 48 ml de água destilada estéril, aquecer até

completa dissolução. Misturar a gelatina aos demais ingredientes, ajustar o pH a 7,5 com hidróxido de sódio 1N. Adicionar o vermelho de fenol, misturar. Distribuir 10 ml em tubos de rosca 16x150mm, autoclavar a 121°C / 15 minutos. Caso o meionao seja utilizado em 8 horas, desaerar em banho de água a 50-70°C durante 2 a 3 horas.

SFP Agar Base pH final 7,6 (OXOID CM 587)

- Triptose 15,0
- Soytone peptone 5.0 g
- Proteose Peptona .7.5 g
- Extrato de levedura . 5.0 g
- Sodio Metabissulfo 1.0 g
- Citrato Ferrico de Amonia . 1.0 g
- Agar 19.0 g

Dissolver 47g / 900ml. Esterilizar a 121°C / 15 minutos. Esfriar a 50°C e adicionar os antibióticos (0.00075g de Polimixina e 0.0024g de Kanamicina para cada 200 ml de meio pronto). Separar 50 ml do meio (superfície), para o restante (150ml) adicionar 15 ml de solução gema de ovo 50%.

- **Caldo Fraser pH final 7,2 (OXOID – CM 895)**
 - Proteose Peptona 5,0g
 - Triptona 5,0g
 - Extrato de Carne 5,0g
 - Extrato de Levedura 5,0g
 - Cloreto de Sódio 20,0g
 - Fosfato Dissódico hidrogenada 12,0g
 - Fosfato de Potássio Dihidrogenado 1,35g
 - Esculina 1,0g
 - Cloreto de Lítio 3,0g

Dissolver 28,7g/ 500ml. Esterilizar a 121°C / 15 minutos. Dissolver o conteúdo de uma ampola de citrato de amonio (500mg) e uma ampola de antibioticos (12,5 mg de acriflavina + 10 mg de acido nalidixico) em 1 ml de agua destilada esteril cada e adicionar ao meio resfriado a 50°C. Para preparar caldo Fraser adicionar mais uma ampola de antibioticos no Caldo Half Fraser.

▪ **Reinford Clostridial Medium Agar (pH final 6.8 - OXOID CM149)**

- Glicose 5,0g
- Extrato de Levedura 3,0g
- Extrato de Carne 10,0g
- Peptona 10,0g
- Amido 1,0g
- Cloreto de Sódio 5,0g
- Acetato de Sódio 3,0g
- Hidroclorato de cisteína 0,5g
- Agar 15,0g
- Água destilada 1 L

Dissolver 38g / Litro. Esterilizar a 121°C / 15 minutos

▪ **Duncan & Strong - Formulado (Duncan & Strong, 1968)**

- Extrato de Levedura 4,0g
- Proteose Peptona 15,0g
- Amido Solúvel 4,0g
- Tioglicolato de Sódio 1,0g
- Fosfato de Sódio Dibásico 10,0g
- Água destilada 1 L

Dissolver 34g / Litro. Esterilizar a 121°C / 15 minutos

▪ **Meio Agar Gema de Ovo – Formulado pH 7,6**

- Caldo Nutriente 2,4g
- Agar 6,0g
- Lactose 3,0g
- Vermelho Neutro – 0,9 mL de solução 1% em Água destilada
- Água 1L
- Solução gema de ovo 30 ml

Dissolver 12,3g / Litro. Esterilizar a 121°C / 15 minutos. Esfriar a 50°C e adicionar 30ml de solução gema de ovo.

▪ **Cooked Meat pH final 7,2 (DIFCO – 226730)**

- Coração de bovino 98,0g
- Proteose Peptona 20,0g
- Dextrose 2,0g
- Cloreto de Sódio 5,0g
- Água 1L

Dissolver 125g / Litro. Esterilizar a 121°C / 15 minutos.

- **Nutiente Agar (DIFCO - 234000)**

- Extrato de Carne 3,0
- Peptona 5,0g
- Agar 15g
- Água 1 L

Esterilizar a 121°C / 15 minutos.

- **Tryptic Soy Agar (DIFCO)**

- Digestivo Pancreático de caseína 15.0
- Digestivo enzimático de soja 5,0g
- Cloreto de sódio 5.0g
- Agar 15.0g
- Água 1 L

Esterilizar a 121°C / 15 minutos.

- **Caldo de Fígado (DIFCO)**

- Extrato de carne (de 500g) – 20g
- Proteose Peptona 10g
- Cloreto de sódio 5.0g
-
- Água 1 L

Esterilizar a 121°C / 15 minutos.

- **Litmus milk (DIFCO)**

- Leite em pó desnatado – 100g
- Litmus 0,75g
- Água 1 L

Esterilizar a 121°C / 15 minutos.