

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

**“DIAGNÓSTICO DA QUALIDADE DE RICOTAS
COMERCIALIZADAS NO MUNICÍPIO DE CAMPINAS-S.P. ”**

Luciana Maria Ramires Esper
Farmacêutica-bioquímica-industrial

Prof. Dr. Arnaldo Yoshiteru Kuaye
Orientador

Dissertação apresentada à Faculdade de Engenharia de Alimentos da
Universidade Estadual de Campinas, para obtenção do título de Mestre em
Tecnologia de Alimentos.

CAMPINAS-2006

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA F.E.A. – UNICAMP

Esper, Luciana Maria Ramires

Es64d Diagnóstico da qualidade de ricotas comercializadas no
município de Campinas-S.P./ Luciana Maria Ramires Esper.

--

Campinas, SP: [s.n.], 2006.

Orientador: Arnaldo Yoshiteru Kuaye

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de
Campinas.

Faculdade de Engenharia de Alimentos.

Título em inglês: Quality diagnostic of the ricotta cheese at Campinas city – S.P.

Palavras-chave em inglês (Keywords): Ricotta cheese, *Bacillus cereus*, *Listeria*,
Enterotoxins, Nutritional labelling

Titulação: Mestre em Tecnologia de Alimentos

Banca examinadora: Arnaldo Yoshiteru Kuaye

Walkiria Hanada Viotto

Valeria Christina Amstalden Junqueira

Maria Helena Castro Reis Passos

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Arnaldo Yoshiteru Kuaye

Orientador

Dra. Maria Helena Castro Reis Passos

(Membro)

Dra. Valéria Christina Amstalden Junqueira

(Membro)

Prof. Dra. Walkiria Hanada Viotto

(Membro)

*"Ninguém ignora tudo, ninguém sabe
tudo. Por isso, aprendemos sempre".
Goethe*

*À Deus pela vida, pelas bênçãos, pelo amor e proteção,
aos meus pais, exemplos de vida, de caráter e de amor,
aos meus irmãos pelo apoio e suporte,
ao meu avô Carlos, à minha avó Dalila, linda,
exemplos de vida, de alegria e de força.
Muito Obrigada, amo muito vocês!!!!
Dedico este trabalho*

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Arnaldo Yoshiteru Kuaye, pela orientação, confiança, apoio, colaboração, dedicação e empenho na realização deste trabalho. MUITÍSSIMO obrigada !!!!! Aprendi muito com o senhor, e continuarei aprendendo!!!!

À Dra. Dirce Kabuki, pelo apoio no desenvolvimento deste trabalho, pelas valiosas sugestões, pela ajuda na PCR, pela amizade, pelo dia a dia do laboratório. Uma pessoa muito especial, a qual tenho muito carinho, admiração e respeito. Muito Obrigada Dirce!!!!

Aos membros da banca examinadora, pelas valiosas sugestões na conclusão do trabalho: Dra. Maria Helena Catsro Reis, obrigada pelas sugestões, dicas, auxílio e carinho;

Prof. Dra. Walkíria Hanada Viotto, por permitir desenvolver parte dos experimentos no laboratório de Leite e Derivados, pelo auxílio na interpretação dos dados físico-químicos, pelo conhecimento transmitido sobre queijos;

Dra. Valeria Amstalden Junqueira, meu muitíssimo obrigado pela amizade, por me ensinar microbiologia de alimentos quando fiz estágio no ITAL, com tanto carinho, amor, e dedicação, um exemplo de profissional, da qual tenho muito carinho, admiração e respeito. Muito obrigada!!!!

À minha mãe, que sempre me mostrou o amor à pesquisa e é minha referência como pessoa e como profissional. Ao meu pai, que com sua integridade, caráter e amor sempre me apoiou e me deu todo suporte para realizar meus sonhos. Obrigada à toda minha família. Eu os amo muito e serei eternamente grata.

À Faculdade de Engenharia de Alimentos da Unicamp, em especial ao Departamento de Tecnologia de Alimentos (secretaria, professores e laboratórios).

Ao amigos do Laboratório de Higiene e Legislação: Dirce, D. Denir, Vanessa, Maristela, Eduardo, Andréa, Raquel, Patrícia Bonnets (pelo auxílio nas análises físico-químicas), Juliane e Celina, muito obrigada pela convivência maravilhosa, auxílio na realização deste trabalho, amizade e carinho.

À todos do Laboratório de Leite e derivados: Bete, Nelson (in memoriam), Renata Perez (pelo treinamento e convivência maravilhosa em casa), Pri Mamede, Pri Hoffman, Clarissa, Pri Viana, Denise e Guillaum, muito obrigada pela amizade e ajuda nas análises físico-químicas.

Ao Laboratório de Toxinas Microbianas-DCA: Prof^o José Luiz Pereira, Norma Miya, Karen Pereira e D. Laura muito obrigada pelo auxílio na pesquisa, pelo carinho e exemplo de profissionalismo. Aprendi muito com vocês!!!

Aos amigos do Laboratório de Microbiologia de Alimentos do ITAL pela amizade, carinho e apoio. Vocês foram muito importantes quando comecei na microbiologia de alimentos, me incentivaram a fazer o mestrado e estarão sempre no meu coração. Muito Obrigada!!!!

Aos amigos, pessoas especiais, aos quais agradeço muito : Carol Sousa, Vanessa Rosa, Manu Pilarski, Rosana Siqueira, Gui Cava, Anderson, D. Dionir, Juliano Souza, Miriam Ana Lourdes, Ana Maria, Pri, Ju, Lu Nishi, Eduardo, Maristela, Alessandra, Lu Fontes, Nelisa, Raquel, Andréa, Paty, Ricardo, Eveline, Noemi e Nice. Muito Obrigada pela amizade e muitos momentos especiais!!!!

À CAPES pela bolsa de estudo a mim concedida.

À Fapesp pelo auxílio financeiro à pesquisa.

À todos, que direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho .

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	x
LISTA DE TABELAS	xi
RESUMO	xii
ABSTRACT	i
ABSTRACT	xv
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	5
2.1 Queijo	5
2.2 Soro de Queijo	6
2.3 Ricota	7
2.4 Microrganismos patogênicos e deteriorantes em queijos	10
2.4.1 Coliformes termotolerantes	10
2.4.2 Estafilococos enterotoxigênicos, coagulase positiva e negativa	11
2.4.3 <i>Salmonella</i> spp	16
2.4.4 <i>Listeria monocytogenes</i>	16
2.4.5 <i>Bacillus cereus</i>	20
2.4.6 Bolores e leveduras	24
3. MATERIAL E MÉTODOS	26
<u>3.1 Material</u>	
3.1.1 Amostras	26
<u>3.2 Métodos</u>	
3.2.1 Amostragem	26
3.2.2 Análises Físico-químicas	27
3.2.2.1 pH	27
3.2.2.2 Teor de Umidade e Extrato Seco Total (EST)	27
3.2.2.3 Teor de Gordura e Gordura no Extrato Seco	27
3.2.2.4 Acidez titulável	28
3.2.2.5 Teor de Nitrogênio Total	28
3.2.2.6 Teor de Sal	28
3.2.2.7 Teor de Cinzas	28

3.2.3	Análises Microbiológicas	
3.2.3.1	Determinação de coliformes termotolerantes (45°)	28
3.2.3.2	Determinação de estafilococos coagulase positiva e negativa	29
3.2.3.3	Detecção de <i>Salmonella spp</i>	29
3.2.3.4	Detecção de <i>Listeria monocytogenes</i>	30
3.2.3.5	Determinação de Bolores e leveduras	30
3.2.3.6	Determinação de <i>Bacillus cereus</i> mesófilo e psicrotrófico	31
3.2.4	Avaliação de características de patogenecidade	
3.2.4.1	Detecção de enterotoxinas estafilocócicas pré formadas nas ricotas comerciais	31
3.2.4.2	Avaliação da capacidade de produção de enterotoxinas pelas linhagens de estafilococos coagulase positiva e negativa isoladas das ricotas comerciais	32
3.2.4.3	Detecção da produção de enterotoxinas diarréicas por cepas de <i>Bacillus cereus</i>	32
3.2.4.4	Avaliação dos genes que codificam os complexos HBL e NHE de <i>Bacillus cereus</i>	33
3.2.4.4.1	Extração do DNA	33
3.2.4.4.2	Reação em cadeia polimerase	33
3.2.4.5	Subtipagem das culturas isoladas de <i>L. monocytogenes</i>	34
3.2.4.5.1	Extração do DNA	35
3.2.4.5.2	Reação em cadeia polimerase	35
3.2.4.5.3	Reação em cadeia da Polimerase com Polimorfismo do comprimento do fragmento de restrição para <i>hlyA</i>	36

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1	<u>Avaliação das características físico-químicas de ricotas comercializadas no município de Campinas-sp e da conformidade das informações nutricionais</u>	37
4.1.1	Características físico-químicas das ricotas	37
4.1.2	Teor de umidade	37
4.1.3	Teor de gordura	41
4.1.4	Teor de proteínas	43
4.1.5	Teor de sal	43
4.1.6	Teor de cinzas	43
4.1.7	Acidez titulável e pH	44
4.1.8	Conformidade de algumas informações nutricionais com as declarações de rotulagem	44

4.2 Avaliação da qualidade microbiológica de ricotas	
4.2.1 Conformidade com os parâmetros legais	46
4.2.1.1 Coliformes termotolerantes	49
4.2.1.2 Estafilococos coagulase positiva	49
4.2.1.3 <i>Salmonella</i>	50
4.2.1.4 <i>Listeria monocytogenes</i>	50
4.2.2 Avaliação microbiológica complementar	52
4.2.2.1 Bolores e leveduras	52
4.2.2.2 <i>Bacillus cereus</i>	55
4.2.2.3 Estafilococos coagulase negativa	58
4.2.2.3 Relação entre prazo de validade, condições de estocagem e qualidade microbiológica	58
4.3 Avaliação de fatores de riscos associados as amostras de ricotas comerciais	61
4.3.1 Enterotoxina estafilocócica pré-formada nas ricotas comerciais	61
4.3.2 Produção de enterotoxinas por isolados de estafilococos coagulase positiva e negativa	61
4.3.3 Enterotoxina e perfil toxigênico de <i>Bacillus cereus</i> isolados de amostras comerciais de ricotas	65
4.3.4 Patogenicidade das cepas isoladas de <i>Listeria monocytogenes</i>	69
5. CONCLUSÕES	71
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	73
APÊNDICE A	88
Lista de ingredientes e informação nutricional das 15 marcas de ricotas analisadas.	
APÊNDICE B	93
Esquema método ELFA	
APÊNDICE C	94
Esquema teste BDE-VIA (TECRA)	
APÊNDICE D	
Foto gel de eletroforese da PCR de alguns genes codificadores de enterotoxinas de <i>B. cereus</i>	95
APÊNDICE E	97
Foto do gel de eletroforese do polimorfismo alélico do <i>hlyA</i> após digestão enzimática.	

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Classificação das amostras de ricota em relação ao teor de gordura	41
Figura 2	Porcentagem das amostras em desacordo com os limites estabelecidos pela Resolução RDC 12/2001	48
Figura 3	Distribuição da contagem de bolores em 40 amostras de ricotas	54
Figura 4	Distribuição da contagem de leveduras em 40 amostras de ricotas	54
Figura 5	Faixas de contagens de <i>B.cereus</i> nas 45 amostras analisadas	56

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Condições para crescimento de <i>S.aureus</i> e produção de enterotoxinas	14
Tabela 2	Surtos de intoxicação estafilocócicas relacionadas ao leite e seus derivados	15
Tabela 3	Características diferenciais das espécies de <i>Bacillus spp</i> pertencentes ao grupo IA	21
Tabela 4	Primers utilizados para a caracterização de isolados de <i>B. cereus</i>	34
Tabela 5	Primers utilizados na subtipagem dos isolados de <i>L. monocytogenes</i>	36
Tabela 6	Composição média das três amostras de quinze marcas comerciais de ricota	38
Tabela 7	Composição físico-química das 45 amostras de ricota	39
Tabela 8	Distribuição das marcas em função das diferenças entre valores experimentais e declarados nos rótulos de ricotas	45
Tabela 9	Padrões microbiológicos para queijos de muita alta umidade	47
Tabela 10	Avaliação microbiológica de ricotas comerciais de acordo com os padrões da Resolução RDC nº 12/2001	49
Tabela 11	Espécies de <i>Listeria</i> isoladas de ricotas e sua distribuição entre as amostras analisadas.	51
Tabela 12	Resultados obtidos nas determinações microbiológicas complementares à Resolução RDC nº 12/2001.	53
Tabela 13	Prazo de validade e temperatura de estocagem descritos nos rótulos das amostras de ricotas	60
Tabela 14	Características dos estafilococos produtores de enterotoxinas isolados de amostras de ricotas	63
Tabela 15	Perfil toxigênico de cepas de <i>B. cereus</i> isoladas de ricotas	66

Tabela 16	Comparação entre os resultados obtidos através da técnica PCR para o gene <i>nheA</i> e o imunoensaio Tecra BDE-VIA para <i>B. cereus</i>	68
Tabela 17	Subtipagem dos treze isolados de <i>Listeria monocytogenes</i>	70

RESUMO

A ricota é um tipo de queijo fresco, de origem italiana, obtido pela precipitação das proteínas do soro do queijo, por acidificação associada ao calor, cuja produção aumenta a cada ano, justificado em parte pela procura por alimentos mais saudáveis e de baixo valor calórico. O teor de umidade, em geral de 70%, caracteriza a ricota como sendo um alimento de muito alta umidade, o que a torna bastante susceptível à contaminação microbiana, podendo ocasionar doenças de origem alimentar, mesmo sendo submetida à refrigeração. O objetivo desse trabalho foi o de avaliar a qualidade microbiológica e parâmetros físico-químicos de amostras de ricotas comercializadas no município de Campinas-S.P. A conformidade das informações nutricionais declaradas nos rótulos, com o estabelecido pela RDC nº 360/2003 da ANVISA foi avaliada. Para qualidade microbiológica foi utilizada como referência a Resolução da Diretoria Colegiada nº 12/2001 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária, além de pesquisas complementares como a contagem de bolores e leveduras, *Bacillus cereus* mesófilos e psicrotróficos e sua capacidade de produção de toxinas, a presença de enterotoxinas estafilocócicas na ricota e a produção destas por cepas isoladas de estafilococos, e os fatores de virulência de *Listeria monocytogenes* isoladas das amostras. Os resultados das análises físico-químicas demonstraram grande variabilidade em todos os parâmetros avaliados entre as amostras e marcas. Particularmente em relação à gordura, segundo a Portaria nº 146/96 do Ministério da Agricultura do Abastecimento e da Reforma Agrária, 8,89% das amostras seriam classificados como queijo magro, 42,22% queijo semi- gordo, 40,00% queijo gordo e 8,89% como queijo extra- gordo. Na maioria dos rótulos as informações nutricionais se apresentavam em desacordo com a legislação (> $\pm 20\%$ de tolerância) sendo 60% em relação à proteína, 60% em relação ao valor energético total e 66,7% em relação à gordura. Estes resultados enfatizam a necessidade do estabelecimento de padrões de identidade para melhor controle da qualidade do produto e segurança do consumidor. Os resultados das análises microbiológicas demonstraram que 46,7% das amostras estavam em desacordo com o padrão estabelecido pela RDC nº 12/2001. O número de amostras acima do

permitido pela legislação em relação a coliformes termotolerantes foi de 46,7%, estafilococos coagulase positiva, 2,2% e *Listeria monocytogenes*, 6,7% . Não foi isolada *Salmonella* em nenhuma das amostras. Além dos critérios microbiológicos exigidos pela legislação uma avaliação complementar mostrou que 51,1% das amostras estavam contaminadas por *B.cereus*, sendo que 28,9% com contagens na faixa de 10^4 a 10^6 UFC/g; 47,5% contaminadas por bolores e 97,5% por leveduras ambas com elevado nível de contaminação. Embora não tenha sido detectada a presença de toxinas estafilocócicas nas ricotas, 23,64% dos isolados de estafilococos eram produtores de toxinas. Destes, 69,23% eram estafilococos coagulase negativa e 30,77% estafilococos coagulase positiva, evidenciando a importância dos estafilococos coagulase negativa. Quanto ao potencial enterotoxigênico de *B. cereus*, 85,7% (36/45) dos isolados analisados, foram positivos para o Kit BDE-VIA. Foram identificados 11 perfis toxigênicos na pesquisa de genes codificadores de enterotoxinas pela técnica de PCR, atestando o alto potencial enterotoxigênico dos isolados de *B.cereus*. Na avaliação da patogenecidade dos isolados de *Listeria monocytogenes*, 100% apresentaram o gene *actA* do tipo 4 e *hly* do tipo 1, classificados portanto, como linhagem do tipo I, esta linhagem encontrada na maior parte dos surtos e casos de listeriose em humanos. O presente trabalho revela que a ricota deveria merecer maior atenção por parte da comunidade científica, setor produtivo e órgãos de vigilância sanitária visando a melhoria da qualidade e conseqüente segurança do consumidor tendo em vista o seu consumo crescente e utilização em dietas especiais.

ABSTRACT

Ricotta is a soft white cheese, of Italian origin, obtained from the precipitation of proteins from the whey of cheese through heating associated with acidification. The production of ricotta cheese increases every year, thanks to the widespread search for healthier foods with low caloric value. Ricotta cheese is characterized by its high moisture content (70% in general), which makes it susceptible to microbiological contamination and therefore able to cause food poisoning, even when stored under refrigeration. This work evaluates the microbiological quality and some physical-chemical parameters (pH, titratable acidity, moisture, protein, fat, salt and ash) of commercial samples of ricotta cheese at the local market of Campinas city, in the state of Sao Paulo, Brazil. We have first evaluated the compliance of the nutritional information in labels with that established by the applicable regulation RDC nº 360/2003 of ANVISA and the variation between values declared in the labels and those obtained through laboratorial analyses. In order to determine microbiological quality, the standard RDC nº12/2001 from ANVISA was used as reference, as well as complementary research, including the counting of mold, yeast, mesophilic and psychrotrophic *Bacillus cereus* and their potential enterotoxin production capacity. In addition, the presence of staphylococcal enterotoxin in ricotta and the production of enterotoxin by isolated strains of staphylococci, and also the virulence factors of *Listeria monocytogenes* strains isolated from the samples. The physical-chemical analyses resulted in great variability among the samples of ricotta cheese for all the parameters evaluated. Particularly regarding fat, according to regulation Portaria nº146/96 of MAARA, 8.89% of the samples would be considered fat-free cheese, 42.22% low-fat cheese, 40.00% high-fat cheese and 8.89% as extra high-fat cheese. In most of the labels the nutritional information failed to comply with the regulation (over $\pm 20\%$ tolerance): 60% regarding protein content, 60% regarding total energetic value and 66.7% regarding fat content. Such results stress the need for identity standards to improve quality control of the product and consumer safety. According to the results of the microbiological analyses, 46.7% of the samples failed to meet the standards established by the RDC nº 12/2001 regulation. A great deal of the

samples had microbiological content above the levels allowed by the regulation: 46,7%, for thermotolerant coliforms, 2.2% for coagulase-positive staphylococci, and 6,7% for *Listeria monocytogenes*. *Salmonella* was not isolated in any of the samples. Besides the microbiological criteria required by the regulation, a complementary evaluation showed that 51.1% of the samples were contaminated by *B. cereus*, being that 28.9% with countings in the band 10^4 to 10^6 UFC/g; also, 47.5% of the samples were contaminated by mold and 97.5% by yeast, both at high contamination levels. Although the presence of staphylococcal enterotoxins was not detected in the ricotta analyzed, 23.64% of the staphylococci isolated strains were toxin producers. Out of these, 69,23 % were coagulase-negative staphylococci and only 30.77% were coagulase-positive staphylococci, what demonstrates the importance of the coagulase-negative staphylococci strains. As for the enterotoxigenic potential of *B. cereus*, 85.7% (36/45) of the isolated *B. cereus* strains analyzed were positive for the BDE-VIA Kit. PCR technique was applied to enterotoxin code genes and identified 11 toxigenic profiles, what demonstrates the high enterotoxigenic potential of the isolated *B. cereus* strains. In the assessment of the pathogenic potential of isolated *L. monocytogenes* strains, 100% presented the genes *actA* type 4 and *hly* type 1, therefore lineage I was found in most of the outbreaks and isolated cases of listeriosis in human beings. This work points out that ricotta cheese should be given greater attention by the scientific community, the productive sector and the food safety agencies aiming at the improvement of the quality of the product and therefore the security of the consumer, inasmuch as ricotta cheese has been increasingly consumed and used in special diets.

Keywords: ricotta cheese, *Bacillus cereus*, *Listeria*, staphylococci enterotoxins and nutritional labelling

1. INTRODUÇÃO

O leite e seus derivados, assim como as carnes e os ovos, correspondem à maior parte da parcela protéica de origem animal ingerida pelo homem. Dentre os vários produtos derivados do leite, o queijo se destaca por ser o mais consumido, sendo que a produção brasileira em 2003 foi de aproximadamente 488.053 toneladas (ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE INDÚSTRIAS DE QUEIJOS, 2004). Sua popularidade é atribuída ao sabor, à conveniência, versatilidade de uso, ampla variedade de tipos, além do alto valor nutricional. Segundo Beresford et al. (2001), existem mais de 1.000 variedades de queijos, em diversos formatos, sabores e embalagens.

A ricota é um queijo fresco de origem italiana, obtido pela precipitação das proteínas do soro do queijo, (preferencialmente do Minas frescal, Minas padrão e mussarela) por acidificação associada ao calor. A elaboração da ricota visa agregar valor ao soro, considerado um resíduo.

A produção anual brasileira de ricota aumentou significativamente nos últimos anos. Em 1991 era de cerca de 4,1 t e no ano de 2003 praticamente dobrou, passando para 8,2 t (ABIQ, 2004). Esse aumento expressivo, tem como um dos fatores, a busca crescente de uma alimentação mais saudável e com baixo valor calórico. Verifica-se, portanto, a necessidade da garantia da qualidade e segurança para este tipo de produto.

A ricota possui alto conteúdo protéico (10 a 14%), baixo teor de gordura (4 a 5%), apresenta alto grau de digestibilidade, consequência de sua boa solubilidade no suco gástrico e pH entre 4,9 a 6,1. Em geral, é comercializada sem sal ou com porcentagem reduzida (0,1%). O teor de umidade (acima de 70%) caracteriza a ricota como sendo um alimento de muita alta umidade, o que a torna muito susceptível à contaminação microbiana. Mesmo sendo armazenada sob refrigeração, apresenta uma vida de prateleira muito limitada, de até cinco semanas, se não houver contaminação por coliformes e, principalmente, bolores e leveduras (HOUGH et al.,1999; KOSIKOWSKI; MISTRI,1999).

A análise de marcas diferentes de ricota comercializadas no município de Alfenas-MG, mostrou que 66,7% das amostras estavam fora dos padrões estabelecidos pela Resolução da Diretoria Colegiada (RDC) nº 12/2001 (BRASIL, 2001a) (RAIMUNDO, 2004).

A análise de 4 pratos contendo ricota servido em empresa aérea brasileira mostrou que 3 (75%) apresentaram *Escherichia coli*, sendo dois com valores iguais a $6,5 \times 10^2$ UFC/g e um com valores maiores que $3,0 \times 10^4$ UFC/g (BELTRAN et al., 1999).

Na Itália, Cossedu et al. (1997) analisaram 32 amostras de ricota e verificaram presença de enterococos, microrganismos aeróbios mesófilos e *Bacillus cereus*, não sendo encontrado *Staphylococcus aureus*, *Listeria*, *Salmonella spp* e *Escherichia coli*.

Nos Estados Unidos, segundo a Food and Drug Administration (FDA, 2004), em 2003 o Departamento de Agricultura da Geórgia (E.U.A) promoveu o recolhimento de 3 t de queijo ricota de uma marca específica devido à presença de *Listeria monocytogenes*. Um caso de listeriose causado pelo consumo de ricota foi registrado em New Jersey em 1999. Os níveis de contaminação de *Listeira* variavam de 10^2 a 10^6 UFC/g nas amostras de ricotas envolvidas neste caso (RYSER, MARTH, 1999).

O controle de *B.cereus*, no processamento de produtos lácteos, pode apresentar dificuldade devido à sua capacidade de esporulação e por ser um contaminante potencial do leite e do ambiente. A característica hidrofóbica dos esporos pode promover a formação de biofilmes nas superfícies de contato com alimentos, de difícil remoção pelos procedimentos de higienização (ANDERSSON et al., 1995). A pasteurização não é suficiente para eliminação deste patógeno cujos esporos são termorresistentes. Muitas cepas de *B. cereus* se apresentam com características psicrotróficas, sendo possível seu crescimento em temperaturas baixas como 4 a 6°C, tais cepas também podem ser produtoras de enterotoxinas (DUFRENNE et al., 1994; DUFRENNE et al., 1995). No período de 1986 a 1989, ocorreram surtos de intoxicação por *B. cereus* na Espanha e na

Holanda, cujas cepas cresceram a 7°C e não à temperatura usual de microrganismo mesófilo (VAN NETTEN et al., 1990).

No Brasil, a ricota é consumida, tanto em lanches naturais (sem tratamento térmico), como em pratos aquecidos (lasanhas, canelones e pizzas, entre outros); em ambos casos, verifica-se a necessidade de uma atenção maior em relação às toxinas produzidas por *B. cereus* e *S. aureus*.

O Regulamento de Inspeção Sanitária de Produtos de Origem Animal (BRASIL, 1997) é o único diploma legal brasileiro vigente onde se descreve alguns parâmetros de identidade e qualidade para a ricota. O artigo 610 define ricota fresca como um produto obtido da albumina do soro de queijos, adicionado de leite em até 20% do seu volume. Algumas características sensoriais, tais como consistência, textura, cor, além de formato e peso também são estabelecidas.

Em geral, observa-se no mercado a oferta de ricotas com diferentes características, fato este motivado pela produção artesanal e também pela ausência de regulamento técnico mais definido. A inexistência de padrões legais pode ser prejudicial ao próprio controle oficial de qualidade destes produtos; por exemplo, a falta de definição de um parâmetro físico-químico, como o teor de umidade, dificulta a interpretação dos resultados do controle microbiológico conforme estabelecido na RDC nº 12, de 02/01/2001 (BRASIL, 2001a).

Souza et al. (2000) avaliaram trinta amostras de ricota, de cinco marcas diferentes, comercializadas na cidade de Belo Horizonte-MG, e observaram a variabilidade de padrões físico-químicos das amostras em relação à Portaria 146, de 07 de março de 1996 (Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Queijos)(BRASIL, 1996). Assim, 16,67% das amostras poderiam ser classificadas como sendo queijo magro, 23,33% queijo semi-gordo, 60% queijo gordo. Também, 3,33% das amostras poderiam ser classificados como queijo de média umidade, 3,33% de alta umidade e 93,34% de muito alta umidade.

Neste trabalho, o objetivo geral foi realizar o diagnóstico da qualidade da ricota oferecida ao consumidor, baseado em avaliações físico-químicas e microbiológicas, o que poderá contribuir no estabelecimento de diretrizes para

fixação de padrões de identidade e qualidade mais específicos. Assim, como objetivos mais específicos, destacamos:

- Avaliar a conformidade das informações nutricionais declaradas nos rótulos com o estabelecido pela RDC nº 360 de 23/12/2003 (BRASIL,2003 a) e a variação entre os valores declarados e aqueles obtidos por análises laboratoriais
- Avaliar a ocorrência e toxigenicidade dos isolados de *Bacillus cereus* mesófilos e psicrotróficos;
- Avaliar a ocorrência de *Listeria monocytogenes* e os fatores de virulência a ela associados;
- Avaliar a presença de enterotoxinas produzidas por cepas de estafilococos isoladas nas amostras.

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Queijo

Queijo é um produto fresco ou maturado que se obtém por separação parcial do soro do leite ou leite reconstituído (integral, parcial ou totalmente desnatado), ou de soros lácteos, coagulados pela ação física do coalho, de enzimas específicas, de bactéria específica, de ácidos orgânicos, isolados ou combinados, todos de qualidade apta para uso alimentar, com ou sem agregação de substâncias alimentícias e/ou especiarias e/ou condimentos, aditivos especificamente indicados, substâncias aromatizantes e matérias corantes (BRASIL,1996).

Originalmente, a fabricação de queijos foi concebida com o objetivo de estender a vida de prateleira do leite e conservar seus componentes nutricionais (BERESFORD, 2001).

A produção de queijo no Brasil, cresce a cada ano; em 1995 foram produzidas 360 mil toneladas; já em 2003, a produção atingiu 480 mil toneladas (BRASIL, 2003b).

As bactérias patogênicas, que constituem maior ameaça à segurança de queijos são: *Salmonella spp*, *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes* e *Escherichia coli* patogênica (De BUYSER et al., 2001).

Carvalho (2003) analisou 31 amostras de queijo Minas frescal produzido por acidificação direta (AD), 31 por ultrafiltração (UF) e 31 por adição de cultura láctica (CL), encontrando contagens acima do Limite Máximo Estabelecido (LME) pela legislação para coliformes termotolerantes em 64,5% das amostras AD, 29% das CL e 9,7% das UF. Quanto a estafilococos coagulase positiva, os resultados acima do LME foi de 12,9% para CL, 9,7% para AD, e 0% UF . Detectou-se *Listeria spp* em 7 amostras AD (22,6%) e em 4 amostras CL (12,9%), não sendo detectada em UF. Não foi isolada *Salmonella* em nenhuma das amostras analisadas.

Silva et al. (2003), coletaram 218 amostras de ambientes e linhas de produção de duas indústrias de laticínios produtoras de queijo Minas Frescal. Treze amostras foram positivas para *Listeria*, sendo 9 *Listeria innocua*, 2 *Listeria grayi* e 2 *Listeria monocytogenes* sorotipos 4b e 1/2 b, ambos freqüentemente envolvidos em surtos de listeriose. As cepas foram isoladas de leite cru, ambiente e piso da sala de refrigeração.

O Centro de Vigilância Sanitária (CVS) e o Instituto Adolfo Lutz (IAL) planejaram e coordenaram a execução do Programa Paulista 2002, cujo objetivo foi monitorar os produtos alimentícios quanto aos requisitos de qualidade e conformidade com a legislação em vigor, visando assegurar à população o consumo de produtos confiáveis. De 123 amostras de queijos Minas Frescal analisadas, 60,2% (74/123) estavam fora dos padrões, sendo 28,4% (35/123) insatisfatória por parâmetros microbiológicos, 34,1% (42/123) por parâmetros físico-químico e 14,6% (18/123) por não conformidades na rotulagem, como: não conter registro no Ministério da Agricultura, não declarar o conteúdo líquido e apresentar as informações obrigatórias de rotulagem (fabricante, informação nutricional e data de validade) de forma ilegível (CVS, 2002).

2.2 Soro de Queijo

O soro de queijo é um subproduto da indústria de laticínios que apresenta boas propriedades funcionais e elevado valor nutritivo (proteínas e lactose), com superioridade em relação às outras proteínas para a nutrição humana, devido fundamentalmente ao perfil de aminoácidos da lactoalbumina. Considerando o valor nutricional do soro de queijo, principalmente no que se refere aos aminoácidos essenciais, verificou-se que este fornece quantidades significativas das necessidades de isoleucina, lisina, cistina, metionina, treonina, triptofano e valina. Esses dados são importantes quando se estima que cerca de 1 bilhão de pessoas nos países em desenvolvimento vivem em situação de pobreza e, portanto, com risco nutricional por não disporem de renda mínima para o consumo básico em alimentação. Pelo menos 40% da população brasileira está incluída neste quadro. Neste contexto, o

aproveitamento do soro na elaboração de produtos alimentícios, poderia ter um reflexo importante do ponto de vista social (SIQUEIRA, 2002).

Movidos pelo interesse de aproveitar essa fonte de nutrientes ou de encontrar uma alternativa para o controle da poluição causada por esse resíduo, muitos países optaram por utilizar o soro de queijo em produtos alimentícios, nas mais diversas formas. O soro vem sendo incorporado vantajosamente em produtos cárneos, lácteos, massa, produtos de padaria, confeitaria, sopas, misturas desidratadas, sobremesas congeladas, chocolates e bebidas (CHIAPPINI; SANTOS, 1995).

As boas condições higiênico-sanitárias do soro são importantes para que este produto não se torne além de um carreador de nutrientes, um veiculador de microrganismos nocivos à saúde do consumidor.

Chiappini, Franco e Oliveira (1995b,c), analisaram 30 amostras de soro provenientes da fabricação de queijo Minas Frescal, em relação à coliformes totais, coliformes termotolerantes e *Staphylococcus aureus*. Quanto aos coliformes totais 53,3% das amostras apresentaram contagens de 2400 ou mais NMP/g; 40% acima de 2400 NMP/g de coliformes termotolerantes e 20% com contagens superior a 10^4 UFC/g de *Staphylococcus aureus*.

Devido ao seu valor nutritivo e as suas condições de temperatura e pH, favoráveis ao crescimento microbiano, a vida útil do soro como produto inalterado é extremamente curta (VIEIRA et al., 1985 apud CHIAPPINI, FRANCO, OLIVEIRA, 1995b).

2.3 Ricota

O nome ricota é derivado da palavra latina “recocta”, que significa re-cozido, ou cozido duas vezes. É um produto de origem italiana, mais popular na região sul do país, onde é produzido de várias formas e com leite de várias origens (inicialmente era produzida com leite de cabra). É um produto suave, com textura delicada e agradável sabor (KOSIKOWSKI; MISTRY, 1999).

A principal matéria-prima para a fabricação de ricota é o soro de queijo, e por isso, também é conhecida como queijo albumina, pois esta é uma proteína do soro presente em grande quantidade na ricota. O princípio de fabricação de ricota é baseado na precipitação das proteínas do soro por meio de calor associado à acidificação (SOUZA et al., 2000).

Existem duas formas de aquecimento que podem ser utilizadas: a indireta, que consiste no aquecimento com vapor pela camisa do tanque, e o direto, em que o soro é aquecido diretamente pelo vapor por meio de tubo perfurado. O soro utilizado no processamento deve ser fresco e, de preferência, proveniente do soro dos queijos Minas frescal, Minas padrão ou mussarela, já que o soro de queijos fabricados com corante dão um produto com coloração amarelada, o que não é característico desse produto. Ao soro é adicionado 5-10% (v/v) de leite a 60-65°C (melhorando dessa forma o rendimento e a consistência do produto final), opcionalmente adiciona-se sal 0,1% (w/v), e após atingir 85-90°C, adiciona-se o agente acidificante (ácido láctico, ácido acético, ácido cítrico ou fermento). A precipitação das proteínas ocorre, e logo em seguida, a ascensão (arrastando outros elementos diluídos como caseína e gordura) da mesma, sendo a massa retirada com auxílio de uma concha furada ou escumadeira. A massa obtida é então colocada em formas e levada para câmara fria onde fica por 6 a 24 horas. Normalmente, 1 kg de ricota pode ser obtida de 15-20 litros de soro (KOSIKOWSKI; MISTRY, 1999; MODLER; EMMONS, 2001; PINTADO et al., 2001).

A composição média esperada deste queijo é de 70-73% de umidade, 4-6% de gordura e pH 4,9-6,1 (SOUZA et al., 2000), o que o classificaria, segundo a Portaria 146 de 07 de março de 1996, como queijo magro, com teor de umidade não inferior à 55%, contendo de 10 a 24,9% gordura no extrato seco (BRASIL, 1996). Entretanto, há grandes variações na composição de ricota no Brasil, dificultando sua classificação.

No Brasil, não existe um Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de ricota. A única legislação existente é o Regulamento de Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal (RIISPOA) que no artigo 610 define a ricota como o produto obtido da albumina de soro de queijos, adicionado de leite até 20% do

seu volume, tratado convenientemente, e tendo o máximo de três dias de fabricação. Também estabelece que este queijo deve apresentar formato cilíndrico, peso de 300 g a 1 kg, crosta rugosa, não-formada ou pouco nítida, consistência mole, não-pastosa e friável, textura fechada ou com alguns buracos mecânicos, cor branca ou branco-creme, odor e sabor próprios (BRASIL, 1997).

A legislação é deficiente, não dispondo sobre a composição, a classificação, requisitos de higiene, normas de envasamento e rotulagem, métodos de amostragem e análise, dando margem à grande diversidade de composição. No Brasil são escassos os dados de literatura a respeito dos parâmetros físico-químicos de ricota (SOUZA et al., 2000).

É difícil acreditar que um queijo, que foi acidificado e aquecido à 85-90°C seja veículo de diversos microrganismos, mas fatores como, sala de produção muito úmida, contaminação do ar acentuada, resfriamento lento, alta umidade do queijo e seu pH favorecem a contaminação. Portanto, torna-se imprescindível a implantação e execução das Boas Práticas de Fabricação, para obtenção de ricota de boa qualidade (KOSIKOWSKI; MISTRY, 1999).

A ricota, segundo os padrões microbiológicos e sanitários para alimentos regulamentados pela Resolução RDC nº 12 de 02/01/2001 da ANVISA, se enquadraria no grupo 8.b. (item f) cujos limites máximos são: coliformes a 45°C, 5×10^2 /g ou ml, estafilococos coagulase positiva, 5×10^2 /g ou ml, e ausência de *Salmonella sp* e *L. monocytogenes* (BRASIL, 2001a). De acordo com Raimundo (2004), da análise de 12 amostras, sendo 6 marcas diferentes de ricota comercializadas no município de Alfenas-MG, 66,7% estavam acima do limite máximo estabelecido pela Resolução RDC nº 12/2001 e 100% contaminadas com fungos filamentosos e leveduras.

A análise de 4 pratos contendo ricota servidos em empresa aérea brasileira mostrou que, 3 (75%) apresentaram *Escherichia coli*, dois com valores iguais a $6,5 \times 10^2$ UFC/g e um com valores maiores que $3,0 \times 10^4$ UFC/g (BELTRAN et al., 1999).

Na Itália, Cossedu et al. (1997) analisaram 32 amostras de ricota e verificaram presença de enterococos em 10 amostras com contagens variando de 10^4 a $> 10^6$ UFC/g, microrganismos aeróbios mesófilos em 30 amostras com contagens entre 10 a

> 10^6 UFC/g e *Bacillus cereus* em 2 amostras, com contagens de 10^4 a 10^5 UFC/g, não sendo encontrado *Staphylococcus aureus*, *Listeria*, *Salmonella spp* e *Escherichia coli*.

Nos Estados Unidos, segundo a Food and Drug Administration um caso de listeriose foi registrado em New Jersey em 1999, causado pelo consumo de ricota, com níveis de contaminações que variavam de 10^2 a 10^6 UFC/g.

2,4 Microrganismos patogênicos e deteriorantes em queijos

2.4.1 Coliformes termotolerantes

O grupo dos coliformes termotolerantes é composto principalmente pela *Escherichia coli*, mas algumas espécies de *Enterobacter* e *Klebsiella* também podem crescer a 45 °C produzindo ácido e gás a partir da fermentação da lactose. Esses microrganismos são Gram negativos, catalase positiva, oxidase negativa, bastonetes curtos aeróbios ou anaeróbios facultativos e fermentadores de lactose. Apresentam temperatura ótima de crescimento, variando de modo geral entre 35 °C a 40 °C, com temperatura máxima de crescimento entre 44 a 46 °C. A atividade de água mínima para seu crescimento é de 0,95, com pH ótimo em torno de 6,0 a 7,0, sendo o mínimo a 4,4 e o máximo a 9,0 (ICMSF, 1998; FRANCO; LANDGRAF, 2002).

A *Escherichia coli* faz parte da flora normal do intestino de animais de sangue quente, portanto, a sua presença nos alimentos constitui um indicador de contaminação fecal (PERESI et al., 2001).

Em alimentos processados, a presença de um número considerável de coliformes ou *Enterobacteriaceae* indica processamento inadequado e/ou recontaminação pós-processamento, provenientes da matéria-prima, de equipamento sujo, ou manipulação sem cuidados de higiene, e indica também proliferação microbiana que poderia permitir a multiplicação de microrganismos patogênicos e toxigênicos (FRANCO; LANDGRAF, 2002).

Com relação à tecnologia dos queijos, os coliformes são responsáveis pelo desenvolvimento de estufamento precoce caracterizado pela produção de gás entre 1 a 2 dias após sua fabricação (FOX et al., 2000).

Algumas *E. coli* produzem enterotoxinas e/ou outros fatores de virulência, incluindo fatores invasivos e de colonização que causam doenças diarréicas. As linhagens de *Escherichia coli* consideradas patogênicas, com base nos fatores de virulência, manifestações clínicas e epidemiológicas podem ser agrupadas nas classes: enterotoxigênica (ETEC), enteropatogênica (EPEC); enterohemorrágica (EHEC); enteroagregativa (EAaggEC); enteroinvasiva (EIEC) e difusivamente adesiva (DAEC) (FRANCO; LANDRGRAF, 2002).

A *Escherichia coli* O157:H7 pertence ao grupo EHEC e é um dos microrganismos mais importantes em relação às doenças humanas veiculadas por alimentos. Essas linhagens caracterizam-se pela produção de uma toxina chamada de verotoxina (VT) ou "shiga-like" toxina (ST), similar à produzida pela bactéria *Shigella dysenteriae* tipo I. A VT provoca uma doença chamada colite hemorrágica que, em casos mais graves, resulta em um quadro conhecido como síndrome urêmica hemolítica (HUS). Essas cepas diferem das demais cepas de *E.coli* em algumas características, sendo as mais importantes a não fermentação do sorbitol e a não produção da enzima b-glicuronidase (CENTER FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION, 1995).

Gonzales et al. (2000) analisaram 44 amostras comerciais de queijo Minas frescal, isolando 385 colônias de *E. coli*, das quais 5 eram enteropatogênicas.

Aureli et al. (1992) analisaram 397 amostras comerciais de queijo fresco, sendo que 16,37% das cepas isoladas eram *E. coli*, e destas, 32,3% eram toxigênicas.

2.4.2 Estafilococos enterotoxigênicos coagulase positiva e negativa.

Atualmente são descritas 32 espécies de estafilococos, das quais, cinco são capazes de produzir uma enzima extracelular, a coagulase. Entre eles, estão o *S. aureus*, *S. hycus* e *S. intermedius*.

As bactérias do gênero *Staphylococcus* são cocos Gram positivos, anaeróbios facultativos, imóveis e não formadores de esporos, quando visualizados em microscópio, aparecem em formas de cachos de uva.

A intoxicação estafilocócica é uma enfermidade transmitida por alimentos quando estes estão contaminados por espécies de estafilococos capazes de produzirem enterotoxinas. Relata-se ser necessária entre 10^5 e 10^6 UFC de *S.aureus*/g de alimentos, para que a enterotoxina seja formada em níveis capazes de provocar intoxicação alimentar. Os principais sintomas da intoxicação são: náuseas, vômitos, diarreias, sudorese, câibras abdominais dolorosas, dores de cabeça e calafrios. O período de incubação varia de 30 minutos a 8 horas, após a ingestão do alimento contaminado (FRANCO; LANDGRAF, 2002).

Os alimentos mais comumente associados às intoxicações causadas pelos estafilococos são: carnes (vaca, porco e frango), produtos cárneos (presuntos, salames e cachorro quente), saladas (com presunto, frango, batatas, ovos e maionese) e produtos lácteos. Muitos destes produtos são contaminados depois do processamento ou cozimento, quando os microrganismos competidores são eliminados (BENNET, BELAY, 2001).

Segundo Silva e Gandra (2004) *S. aureus* é a espécie mais prevalente em surtos de intoxicação alimentar.

Carmo et al. (2002) coletaram amostras de queijos e leite cru relacionados à dois surtos em Minas Gerais. No primeiro surto, 50 pessoas adoeceram após a ingestão de queijo Minas frescal, e no segundo surto, 328 pessoas apresentaram os sintomas após ingestão de leite cru. As análises mostraram que *S. aureus* estava presente ($2,4 \times 10^2$ à $2,0 \times 10^8$ UFC/g) e produziram as enterotoxinas SEA, SEB e SEC.

A produção de enterotoxinas sempre foi atribuída exclusivamente ao *S. aureus*, espécie coagulase positiva, mas casos de intoxicação estafilocócica associados a manteiga, como por exemplo, o ocorrido nos Estados Unidos, em que espécies *S. intermedius* (coagulase positiva) foram isoladas, aumentaram a correlação entre a produção de coagulase e a capacidade enterotoxigênica (BENNET, 1996).

Em 2001, a legislação brasileira de padrões microbiológicos para alimentos foi alterada e uma destas modificações, foi a alteração da determinação de *S. aureus* para enumeração de “estafilococos coagulase positiva”, devido à correlação entre a produção de coagulase e a capacidade enterotoxigênica, (Brasil, 2001). Entretanto, além de espécies de estafilococos coagulase positiva, algumas espécies coagulase negativa possuem capacidade de produção de enterotoxinas como foi evidenciado em meio de cultivo laboratorial (PEREIRA; PEREIRA, 2005; PEREIRA, 1996; OLIVEIRA,1999). Algumas das espécies coagulase negativa relatadas como produtoras de enterotoxinas em meio de cultivo laboratorial foram: *S. epidermides* , *S. saprophyticus*, *S. haemolyticus* e *S. xylosus* (PEREIRA; PEREIRA 2005).

Surtos de intoxicações estafilocócicas associados a espécies coagulase negativas já foram relatados. O primeiro deles ocorreu em Osaka, no Japão, associado ao consumo de leite, em 1959. Nos Estados Unidos, a espécie *S. epidermides* produtora de SEA foi incriminada em um surto envolvendo carne assada. No Brasil, um surto ocorreu devido ao consumo de queijo Minas frescal e leite cru, onde foi identificada a espécie *S. epidermides* produtora de SEC (BRECKINRIDGE, BERGDOLL, 1971; CARMO et al.,2002, VERAS et al., 2003).

O teste de termonuclease tem sido correlacionado com a patogenicidade dos isolados de alimentos. Embora muitos isolados enterotoxigênicos produzam TNase, a produção desta enzima não implica que sejam enterotoxigênicos. Evidências sugerem que a expressão metabólica, que é a base do teste de termonuclease, pode não ser um indicador de patogênese (BENNET,1996).

A melhor forma de se determinar a patogenicidade das espécies de estafilococos é testar os isolados quanto a capacidade de produção de enterotoxinas, já que nenhum dos testes convencionais de identificação tem sido associados conclusivamente à síntese destas (BENNET,1996).

As enterotoxinas estafilocócicas (SE) são proteínas de peso molecular ao redor de 27.000 a 34.000 daltons e são produzidas entre 10 a 46°C, são resistentes às enzimas proteolíticas, termoestáveis, capazes de resistir a tratamentos térmicos como a pasteurização e solúveis em água e solução salina.

As enterotoxinas resistem também a temperatura de 121°C por 3 a 8 minutos (BAIRD PARKER,1990 apud OLIVEIRA,1999).

A inativação das enterotoxinas não dependem somente da temperatura, mas também da composição e pH do meio que as contém (TATINI,1973).

Na **Tabela 1** são apresentadas algumas condições para o crescimento de *S.aureus* e produção de enterotoxinas , atividade de água, concentração de sal, disponibilidade de oxigênio, pH e temperatura.

Onze tipos de enterotoxinas foram identificadas até o momento: SE tipo A (SEA), SEB, três tipos de SEC (SEC1, SEC2, SEC3), SED, SEE, e recentemente, SEG, SEH, SEI e SEJ (SÁNCHEZ et al., 2002). Na literatura são descritos inúmeros surtos de intoxicação alimentar causados pela ingestão de alimentos contendo enterotoxinas pré-formadas.A quantidade de enterotoxina a ser ingerida para causar a doença ainda não é bem conhecida. Entretanto verificou-se que, em humanos, a dose mínima de enterotoxina estafilocócica A, suficiente para o desencadeamento dos sintomas, é de 100 a 200 ng (EVENSON et al., 1988).

Tabela 1- Condições para crescimento de *S. aureus* e produção de enterotoxinas.

Parâmetros	Crescimento de <i>S. aureus</i>		Produção de Enterotoxinas	
	Ótimo	Variação	Ótimo	Variação
Aw	>0,99	0,83-0,99	0,99	≥ 0,86 - 0,99
pH	6 - 7	4 - 10	6 - 7	4 - 9,8
[NaCl]	0	0 - 20	0	0 – 10
Disponibilidade de Oxigênio	Aeróbio	aeróbio/anaeróbio	aeróbia	aeróbia/anaeróbia
Temperatura	37°C	7- 47,8°C	40-45°C	10 - 46°C

Fonte: Tatini (1973)

Em função do risco à saúde, estabeleceu-se, em diversos países, a obrigatoriedade da pesquisa e quantificação da enterotoxina, como parte das ações de vigilância sanitária de órgãos governamentais (SILVA; GANDRA, 2004).

Várias condições, estão associados ao crescimento e produção de estafilococos e suas enterotoxinas, como refrigeração inadequada, preparo de alimentos por tempo prolongado, higiene pessoal deficiente, aquecimento e cozimento inadequado (SORIANO et al., 2002).

Na **Tabela 2** são apresentados alguns surtos de intoxicação estafilocócica envolvendo leite e seus derivados, ocorridos em diferentes países.

Tabela 2- Surtos de intoxicação estafilocócica relacionados ao leite e seus derivados.

País	Ano	Nº casos	Alimento implicado (enterotoxina)	Tipo de leite.
Canadá	1980	62	Queijo (SEA, SEC)	Não- especificado
E.U.A.	1981	16	Queijo	Pasteurizado
Inglaterra	1983	2	Queijo	Pasteurizado
Escócia	1984	27	Queijo de ovelha (SEA)	Cru
Escócia	1985	2	Leite de cabra da fazenda	Não pasteurizado
E.U.A .	1985	860	Leite achocolatado (SEA)	Pasteurizado
Israel	1987	3	Leite de cabra (SEB)	Cru
Inglaterra	1988	155	Queijo Stilton	Não pasteurizado
Brasil	1994	7	Queijo (SEH)	Não especificado

Fonte: De Buyser et al.(2001)

2.4.3 *Salmonella* spp

Salmonella, um gênero da família *Enterobacteriaceae*, compreende bacilos Gram-negativos, anaeróbios facultativos, não formadores de esporos, móveis por flagelos peritríquios, que fermentam glicose, mas não lactose e sacarose, geralmente produzindo gás e H₂S, são oxidase negativa e catalase positiva (ICMSF, 1998). A temperatura ótima para multiplicação de *Salmonella* é próxima à 35-37°C.

As doenças causadas por *Salmonella* são divididas em três grupos: febre tifóide (causadas por *Salmonella typhi*), febre entérica (causadas por *Salmonella paratyphi*) e as enterocolites ou salmoneloses, causadas pelas demais salmonelas. Atualmente, *Salmonella* é um dos microrganismos mais relatados em surtos de origem alimentar, principalmente envolvendo carnes bovinas, aves e ovos. Em relação aos laticínios a contaminação é quase sempre causada por leite cru ou inadequadamente pasteurizado (FRANCO; LANDGRAF, 2002).

Segundo De Buyser et al. (2001), nos 2.861 surtos de origem alimentar ocorridos na França, no período de 1988 a 1997, *Salmonella* foi o principal agente etiológico (49%) e a porcentagem dos derivados do leite (queijos) nestes surtos foi de 1,8%.

Segundo Eleftheriadou et al. (2002), na República de Chipre, entre 1991 à 2000, de 28.835 amostras de alimentos analisados, 1,8% apresentaram *Salmonella* spp. Destas, apenas uma amostra de queijo estava contaminada com *Salmonella* spp

2.4.4 *Listeria monocytogenes*

O gênero *Listeria* é constituído por bactérias em forma de bastonetes Gram positivos, não formador de esporos, anaeróbio facultativo, móvel com flagelos peritríquios, catalase positiva, oxidase negativa. Apresenta crescimento entre temperatura de 2,5 à 44°C sendo capaz de se desenvolver sob refrigeração, e podendo proliferar em alimentos mantidos nessas condições, a faixa de pH para seu desenvolvimento varia de 4,5 a 9,5 (FRANCO; LANDGRAF, 2002; ICMSF, 1998).

O gênero *Listeria* está dividido em sete espécies: *L. monocytogenes*, *L. innocua*, *L. seeligeri*, *L. grayi*, *L. ivanovii* subsp. *ivanovii* e *L. ivanovii* subsp. *londoniensis*. A

L.inocua, e *L. grayi* são consideradas não patogênicas, enquanto a *L.seeligeri*, *L.ivanovii* e *L. welshimeri* raramente causam infecção em humanos (ICMSF, 1998).

Listeria monocytogenes é um dos microrganismos patogênicos de maior severidade à saúde humana. Ela tem sido associada à vários surtos de origem alimentar, e tem como veículo, o ambiente e alimentos (vegetais, carnes, leite e derivados) destacando-se os queijos (LONCAREVIC et al., 1998).

Quando a bactéria é isolada no alimento, geralmente é devido a contaminações pós-processamento ou falha no processo de pasteurização.

A porta de entrada de *L. monocytogenes* em uma indústria é muito diversificado, solo arrastado pelo calçado e vestuário, pelo transportes de materiais, através de animais que excretam o microrganismo, por matérias primas contaminadas e através de pessoas portadoras saudáveis (ROCOURT, 1997 apud GUERRA; BERNARDO, 2004).

Kerr et al. (1993) relataram a presença de *L. monocytogenes* em 7% (7/99) de trabalhadores, dos quais 3 eram vendedores de comida rápida, 1 vendedor de pão, 1 vendedor de peixes, 1 merceeiro, e 1 operador em frigorífico.

Devido à severidade das infecções de *L. monocytogenes*, em que 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 E.U.A. estabeleceu o padrão de “tolerância zero” para o microrganismo em alimentos prontos para consumo. Os padrões microbiológicos da legislação brasileira estabelecem para alguns produtos ausência em 25g de alimento (BRASIL, 2001; ALMEIDA et al,1999).

O desenvolvimento da listeriose depende de fatores como: número de organismos ingeridos, estado imunológico do indivíduo e virulência da cepa envolvida. Entre os neonatos, idosos, pessoas imunocomprometidas e gestantes, pode causar septicemia, encefalite, meningite, aborto espontâneo e morte. Em surtos e casos de listeriose há predominância dos sorotipos 1/2a, 1/2b e 4b (VÁZQUEZ-BOLAND et al., 2001).

Muitas proteínas foram reconhecidas como essenciais para a virulência da *L. monocytogenes*. A Listeriolisina O (LLO) é o principal determinante de virulência em *L.*

monocytogenes e sua atividade hemolítica é observada ao redor das colônias crescidas em placas de ágar sangue. Também é necessária à multiplicação dentro dos macrófagos e células não fagocitárias, bem como na indução da resposta celular do hospedeiro, como por exemplo a proliferação celular, indução da exocitose de muco nas células intestinais e apoptose de células dendríticas (KUHN; GOEBEL, 1999; VÁZQUEZ-BOLAND et al., 2001).

A proteína actA é o principal fator de virulência envolvido no processo intracelular de movimento da *L. monocytogenes*. Sua função específica é a polimerização da actina (KUHN; GOEBEL, 1999).

A actina, o principal componente do citoesqueleto, está presente em células não musculares na forma de monômeros (actina globular) ou em sua forma polimerizada (actina filamentosa). Existe uma correlação positiva entre a taxa de polimerização de actina e a velocidade do movimento bacteriano. O comprimento da cauda é proporcional à taxa de movimento, assim, bactérias que se movimentam rápido apresentam uma cauda longa e bactérias que se movem devagar têm uma cauda de actina curta. Com a ajuda de actina formada, a *L. monocytogenes* pode se mover rapidamente no citoplasma à velocidade de 1,5 $\mu\text{m/s}$ (COSSART; KOCKS, 1994 apud KABUKI, 2004).

A diferenciação e a caracterização de isolados de mesma espécie podem ser realizadas utilizando-se os métodos de subtipagem, podendo ser divididas em grupos genéticos

A PCR-RFLP (Polimorfismo do comprimento do fragmento de restrição), é um método de genotipagem rápido de microrganismos e geralmente, os alvos são os genes de virulência (KABUKI, 2004).

Wiedmann et al. (1997), revelaram a existência de dois alelos para *actA*, que foram designadas como 3 e 4 e também a existência de 8 alelos para *hly*. Com base nos ribotipos e alelos de genes de virulência, os autores dividiram as espécies de *Listeria monocytogenes* em três linhagens distintas : a linhagem I, que contém todos os isolados de surtos alimentares e casos de infecção ao homem e ao animal (cepas dos sorotipos 1/2b, 3b, 3 c e 4b), a linhagem II que contém isolados tanto humanos quanto

animais, mas aparentemente não foram ainda isolados de surtos alimentares (cepas dos sorotipos 1/2a, 1/2c e 3a), e a linhagem III, que ainda não foi isolada de humanos, apenas de animais (cepas do sorotipos 4a e 4c).

Vários trabalhos foram realizados sobre a incidência de *L. monocytogenes* em queijos. Uma atenção especial tem sido dada aos queijos macios italianos. Embora sejam preparados com leite pasteurizado, os queijos podem estar contaminados com *L. monocytogenes*, que podem ter sobrevivido ao tratamento térmico deficiente e ou pode ter vindo de uma contaminação pós-processamento.

Devido aos problemas relacionados aos produtos lácteos, é grande a preocupação com o comportamento desse microrganismo no processamento e estocagem desses produtos, pois o ambiente das plantas de processamento, permite a colonização da bactéria em vários pontos. Assim, é evidente a importância dos programas de Boas Práticas de Fabricação e Procedimentos Operacionais Padronizados, particularmente aqueles envolvendo os processos de limpeza e desinfecção, no controle do microrganismo (KABUKI, 2004).

O primeiro surto de listeriose foi associado ao consumo de salada de repolho cru no Canadá. O repolho havia sido contaminado com o uso de adubo a base de esterco de ovinos, infectados por *L. monocytogenes*. No período entre outubro de 2000 a janeiro de 2001, na Carolina do Norte, doze pessoas apresentaram infecções por *L. monocytogenes*. As investigações revelaram que o causador do surto foi um queijo fresco macio do tipo Mexicano, produzido com leite cru (BOGGS et al., 2001).

Kabuki (2004) analisou 246 amostras do ambiente de produção de queijo fresco (tipo latino) e 111 amostras do queijo, encontrando *L. monocytogenes* em 11,0% das amostras do ambiente e em 6,3% dos queijos. Todos os queijos foram fabricados com leite pasteurizado.

Silva et al. (1998) analisaram 103 amostras de queijos brasileiros obtidos no comércio do Rio de Janeiro e verificaram que, 10,68% estavam contaminadas com *L. monocytogenes*, 12,62% com *L. innocua*, 5,83% com *L. grayi* e 0,97% com *L. welshimeri*.

Nos Estados Unidos, segundo a Food and Drug Administration, um surto de listeriose foi registrado em New Jersey (1999), causado pelo consumo de ricota, com níveis de contaminações que variavam de 10^2 a 10^6 UFC/g (RYSER, MARTH, 1999).

2.4.5 *Bacillus cereus*

Bacillus cereus é uma bactéria que pertence à família *Bacillaceae*, aeróbia, móvel por meio de flagelos peritríquios, produtora de esporos termorresistentes, com habitat natural no solo e vegetais. Suas cepas são catalase positiva e oxidase variável. A esporulação aeróbia e a reação de catalase positiva as distinguem do gênero *Clostridium* (NOTERMANS; BATT, 1998).

Estes microrganismos sobrevivem à várias condições ambientais, devido à sua condição de formar endosporos resistentes ao calor, agentes químicos, desidratação e desinfetantes. São geralmente mesófilos, com temperatura ótima de crescimento variando de 25 a 37 °C, embora pesquisas tenham demonstrado que cepas de *B. cereus*, possuem a capacidade de crescer à temperatura abaixo de 7 °C, com algumas cepas psicotróficas crescendo até a 4°C, e outras com características termofílicas, podendo crescer até a 75°C. Multiplicam-se na faixa de pH entre 4,3 a 9,3 (SCHOENI; WONG, 2005).

A identificação de *B.cereus* é realizada através de provas morfológicas e bioquímicas, cujas características observadas são: bastonete gram positivo produtor de lecitinase, negativo para fermentação de manitol em agar MYP (Mannitol Yolk Polymixin), capaz de utilizar glicose anaerobicamente, redutor de nitrato a nitrito, produtor de acetilmetilcarbinol, capaz de decompor L-tirosina e de crescer na presença de 0,001% de lisozima, móvel, produtor de hemólise, não produtor de cristais de endotoxina e negativo para crescimento rizóide (BENNET; BELAY, 2001).

As espécies de *Bacillus* do Grupo IA apresentam alta similaridade nas suas características, podendo causar dúvidas na identificação (**Tabela 3**). Portanto, várias técnicas baseadas em biologia molecular têm sido desenvolvidas e aplicadas para a caracterização tanto das enterotoxinas quanto para diferenciação dessas espécies de *Bacillus*. Estas técnicas, como por exemplo, fagotipagem, amplificação randômica do

DNA polimórfico (RAPD) e reação da polimerase em cadeia (PCR), tem sido importantes instrumentos para o estudo e diferenciação destes microrganismos (GUELARDI et al., 2002).

Tabela 3. Características diferenciais das espécies de *Bacillus spp.* pertencentes ao Grupo I A.

Características	Espécies de <i>Bacillus</i>				
	<i>cereus</i>	<i>thuringensis</i>	<i>mycoides</i>	<i>anthracis</i>	<i>megaterium</i>
Motilidade	+/- ^a	+/- ^a	- ^a	-	+/-
Hemólise	+	+	+ ^c	- ^b	-
Crescimento rizóide	-	-	+	-	-
Produção de cristais tóxicos	-	+	-	-	-

^a 50 a 90 % das cepas são positivas

^b a maioria das cepas é negativa

^c a maioria das cepas é fracamente positiva

A maioria das cepas de *B. cereus* é capaz de produzir uma série de metabólitos extracelulares, dos quais alguns estão relacionados com seu mecanismo de virulência (FRANCO; LANDGRAF, 2002; ICMSF, 1998).

A patogenicidade do *B. cereus* ainda não é muito bem definida. Este microrganismo produz uma série de fatores de virulência, incluindo múltiplas hemolisinas, fosfolipases e proteases. *Bacillus cereus* causa dois tipos de doenças de origem alimentar: a síndrome diarréica e a síndrome emética além de diversas infecções localizadas ou sistêmicas, como endocardites, meningites, periodontite, infecções oculares, osteomielite e septicemia. Estas patologias são menos freqüentes se comparadas às do trato gastrointestinal. Em geral, a gama de diversas toxinas e fatores

de virulência de *B. cereus*, principalmente em infecções sistêmicas, têm sido pouco estudados (SCHOENI; WONG, 2005; GRANUM, 1994).

É necessário o desenvolvimento de ferramentas para detecção molecular que permitam a rápida caracterização de mecanismos de virulência de isolados clínicos de *B. cereus* (EHLING-SCHULZ et al., 2004).

O primeiro caso documentado de toxinfecção alimentar causada por *B. cereus* foi um surto diarréico, em 1950, pelo consumo de sobremesa de baunilha, onde foram encontradas concentrações de esporos acima de 10^8 UFC/g no amido de milho usado para o preparo deste prato (ANDERSSON et al., 1995).

A síndrome diarréica é caracterizada por diarréia intensa e dores abdominais, raramente ocorrendo náuseas ou vômitos. A duração da doença é de 12 a 24 h e o período de incubação varia de 8 a 16 h. Os sintomas provocados são similares aos causados por *Clostridium perfringens* (GRANUM, 1994; INTERNATIONAL DAIRY FEDERATION, 1993).

Diversos termos têm sido empregados para caracterizar a toxina diarréica: agente diarréico, fator de acúmulo de fluidos, fator de permeabilidade vascular ou simplesmente enterotoxina. Estes termos se referem a uma proteína, produzida durante a fase exponencial de crescimento de *B. cereus*, em pH variando de 6,0 a 8,5, sendo ótima na faixa de 7,0 a 7,5 e temperatura entre 18 a 43 °C. Esta proteína é termolábil, sendo destruída a 55 °C por 20 minutos (GRANUM, 1994).

Várias pesquisas têm sido realizadas a fim de se isolar e caracterizar as enterotoxinas. Entretanto, ainda permanecem dúvidas quanto a estrutura, tamanho e número de componentes dos fatores tóxicos (GUINEBRETIÈRE et al., 2002; HANSEN et al. 2001; SVENSSON et al., 1999; GIFFEL et al., 1997; LUND; GRANUM, 1996, ANDERSON et al., 1995; DUFRENNE et al., 1994).

Atualmente, são conhecidas quatro enterotoxinas produzidas por *B. cereus*: a hemolisina BL (HBL), a enterotoxina não-hemolítica (NHE), a enterotoxina K (CytK) e enterotoxina T (BceT). As três primeiras já foram identificadas em surtos alimentares. O complexo HBL é formado por três componentes denominados *B*, *L*₁ e *L*₂ com pesos moleculares de 35, 36 e 45 kDa, respectivamente. Este complexo requer os três

componentes para tornar máximas as atividades hemolíticas, citotóxicas e dermonecroticas, a ação de permeabilidade vascular e acúmulo de fluido em alças intestinais de coelho (SCHOENI; WONG, 2005, GUINEBRETIÈRE, 2002).

O complexo NHE (nonhemolytic enterotoxin) é composto por três proteínas denominadas *nheA*, *nheB* e *nheC*, com pesos moleculares de 39, 45 e 105 kDa, respectivamente. As três proteínas são necessárias para a máxima atividade citotóxica, embora a combinação de duas delas em elevados níveis, já seja suficiente para promover a atividade citotóxica (SCHOENI;WONG,2005; LUND, GRANUM,1996).

A habilidade do *B. cereus* em produzir NHE é mais comum, com 92 a 100% dos isolados com capacidade de produzi-lo (SCHOENI; WONG, 2005).

Em geral as cepas de *B. cereus* são capazes de produzir NHE; entretanto, apenas cerca de 50% de HBL são detectados (HANSEN; HENDRIKSEN, 2001)

Os alimentos associados aos surtos diarreicos por *B. cereus* normalmente são ricos em proteínas, como produtos cárneos, sopas, vegetais leites e produtos lácteos, com contagens entre 10^5 e 10^7 células ou esporos /g ou ml. A outra doença de origem alimentar causada por cepas de *B. cereus*, é a síndrome emética que é caracterizada por náuseas e vômitos. Sua duração é de 6 a 24 h e o período de incubação varia de 0,5 a 5 h, provocando sintomas similares aos causados por *Staphylococcus aureus* (GRANUM, 1994; IDF, 1993).

A toxina emética foi identificada pela primeira vez no Reino Unido nos anos 70, depois da ocorrência de vários incidentes associados ao consumo de arroz de restaurantes chineses (KRAMER; GILBERT, 1989). Ela é pouco estudada se comparada à toxina diarreica.

A toxicidade tem sido atribuída a um peptídeo cíclico, o cereulídeo, que possui alta estabilidade à temperatura, enzimas proteolíticas e variações de pH. A dose infectante na síndrome emética é de 10^5 - 10^8 células/g. A toxina é formada no alimento final da fase estacionária (KOTIRANTA et al., 2000; GRANUM;LUND 1997).

Segundo Kramer e Gilbert (1989), o nível de contaminação necessário à produção de toxina, em teores suficientes para provocar vômitos, causaria a deterioração visível deste alimento.

Dois kits comerciais foram desenvolvidos para detecção de enterotoxinas de *B. cereus*. O kit BCET-RPLA (Oxoid, Denka Seiken Ltd., Tokio, Japan) é um teste semi quantitativo, que detecta o componente L_2 do complexo HBL, utilizando a técnica de aglutinação passiva reversa em látex, e com limite de detecção de 1ng/mL (SHOENI; WONG, 2005; IDF, 1983); e também o kit “*Bacillus* diarrhoeal enterotoxin-visual immunoassay” BDE-VIA da TecraTM (Bioenterprises Pty.Ltd. Roseville, NSW, Austrália), que é um teste de ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) que detecta a proteína 40-45 kDa do complexo NHE, com limite de detecção de 1ng/ml (SHOENI; WONG, 2005; IDF, 1993).

Algumas das cepas psicotróficas podem produzir enterotoxinas, o que causa preocupação entre as indústrias de alimentos prontos para o consumo e outros de produtos refrigerados (DUFRENNE et al., 1995).

Dufrenne et al. (1994) pesquisando 31 cepas de *B. cereus* encontrados em várias fontes como leite, arroz, produtos derivados de ovos e batatas, constataram que 17% eram capazes de crescer à temperatura ≤ 7 °C e que estas foram produtoras de enterotoxinas pelo teste BDE-VIA.

2.4.6 Bolores e Leveduras

Os fungos são microrganismos largamente distribuídos no meio ambiente, incluindo o ar, a água e solo. Como consequência, os alimentos podem ser contaminados por uma ampla variedade de espécies fúngicas, originárias dessas fontes ambientais. Sob condições favoráveis, eles podem multiplicar-se nos alimentos e provocar deteriorações. Os fungos apresentam grande versatilidade para crescer em condições desfavoráveis a outros microrganismos, crescem em atividade de água de 0,65 até 0,99, pH de 2,0 a 9,0 e temperatura < 0 a 40 °C. Eles utilizam uma grande variedade de substratos como fontes de carbono, nitrogênio e energia. Alguns possuem

capacidade de esporulação como forma de reprodução sexuada e disseminação em diferentes condições (TANIWAKI; SILVA, 2001).

No seu aspecto positivo, os fungos podem colaborar no desenvolvimento do sabor durante a maturação de alguns queijos. Além disso, enzimas utilizadas na elaboração de alimentos processados são derivadas do metabolismo de fungos. No seu aspecto negativo, eles são deteriorantes, o que reduz a vida de prateleira de vários produtos. Se o crescimento fúngico for retardado ou prevenido, pode-se evitar perdas significativas na produção, estocagem e distribuição de alimentos, além de alterações nas características organolépticas, valor nutricional e risco potencial para a saúde do consumidor, devido à produção de micotoxinas. Quanto aos queijos, apesar de constituírem um excelente substrato para crescimento fúngico, possuem moderado risco de contaminação por micotoxinas (FRANCO; LANDGRAF, 2002; TANIWAKI; SILVA, 2001).

As superfícies de equipamentos, mãos, aventais de manipuladores, salmouras e ambientes são as principais fontes de contaminação por estes microrganismos (VILJOEN; WELTHAGEN, 1998).

A presença de bolores e leveduras em índice muito elevado de contaminação no ar e em alimentos pode fornecer várias informações, tais como, condições higiênicas deficientes de equipamentos, multiplicação no produto em decorrência de falhas no processamento e/ou estocagem e matéria-prima com contaminação excessiva (VILJOEN, 2001).

Viljoen e Welthagen (1998) pesquisaram o processamento de queijo Gouda e detectaram elevadas contagens de leveduras, tendo como fontes de contaminação de superfícies de equipamentos, ar, chão, mãos de manipuladores e em especial a salmoura. Uma diversidade de 23 espécies de leveduras, representando 13 gêneros foram caracterizadas no ambiente da indústria.

3 Material e métodos

3.1 Material

3.1.1 Amostras

Foram coletadas 45 amostras de ricota, sendo 15 marcas comerciais diferentes com registro no Serviço de Inspeção Federal (SIF) ou no Serviço de Inspeção no Estado de São Paulo (SISP), no varejo do município de Campinas-SP em três períodos diferentes do ano, apresentando de 10 a 15 dias de fabricação.

3.2 Métodos

As amostras foram analisadas para determinação dos seguintes microrganismos: coliformes termotolerantes (45 °C), estafilococos coagulase positiva, *Salmonella* e *Listeria monocytogenes*; conforme estabelece a Resolução RDC nº 12 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária- ANVISA, de 2 de janeiro de 2001 (BRASIL, 2001a).

Além dos parâmetros microbiológicos definidos pela legislação, foi pesquisada a presença de: *Bacillus cereus* mesófilos e psicrótrófos, estafilococos coagulase negativa, bolores e leveduras.

Análises físico-químicas para determinação de pH, acidez titulável, teor de sal, cinzas, teor de gordura (gordura no extrato seco total), teor de umidade (extrato seco total) e proteína total também foram realizadas.

3.2.1 Amostragem

O procedimento de amostragem foi iniciado com a anotação dos dados descritos nos rótulos dos produtos, relativos à procedência, marca, número de SIF ou SISP,

ingredientes, data de fabricação, prazo de validade e informação nutricional. As amostras de ricota foram retiradas de sua embalagem, após prévia desinfecção com álcool 70% sob condições assépticas, na capela de fluxo laminar. Cada unidade amostral foi homogeneizada e então subdividida para a realização dos ensaios microbiológicos e físico-químicos.

Vinte e cinco gramas de amostra foram pesados em balança semi-analítica, para posterior homogeneização em equipamento tipo “stomacher” com os diluentes específicos para cada microrganismo investigado. Para avaliação de coliformes termotolerantes, bolores e leveduras, estafilococos e *Bacillus cereus*, foi utilizado o mesmo diluente: 225 ml de solução de citrato de sódio a 2 % (Merck) para 25 g das amostras, que após serem homogeneizados foram diluídos em série decimal, com este mesmo diluente. Todas as determinações foram realizadas em duplicata.

3.2.3 Análises Físico-Químicas:

As determinações foram realizadas em triplicata, com exceção do teor de umidade que foi realizado em quadruplicata.

O teste para verificar diferenças entre as médias foi o de Tukey e análise de variância ANOVA.

3.2.2.2 pH

O pH dos queijos foi determinado, por meio de método potenciométrico, utilizando-se pH-metro Marca Micronal, Modelo B374, conforme AOAC (1995)

3.2.2.2. Teor de Umidade e Extrato Seco Total (EST)

O extrato seco total e o teor de umidade do queijo foram determinados segundo o método de secagem até peso constante, em estufa a 105°C (AOAC 1995).

3.2.2.3 Teor de Gordura e Gordura no Extrato Seco

O teor de gordura do queijo foi determinado utilizando-se o método de Gerber (INSTITUTO ADOLFO LUTZ, 1985).

O teor de gordura no extrato seco (GES) foi calculado utilizando-se a fórmula da AOAC (1995), na qual:

$$\text{GES} = \% \text{ de gordura} \times 100 / \% \text{ de extrato seco total.}$$

3.2.2.4 Acidez titulável

A acidez foi determinada por titulação com solução de NaOH 0,1 N conforme o método descrito pela AOAC (1995), adaptado por Yun e Barbano (1995) e expresso em % de ácido láctico.

3.2.2.5 Teor de Nitrogênio Total

A quantidade de nitrogênio total nas amostras foi determinada utilizando-se o método oficial de Kjeldahl (IDF, 1962) e um fator de 6,38 para obter o teor de proteína total segundo a AOAC (1995).

3.2.2.6 Teor de sal

O teor de sal no queijo foi determinado utilizando-se o método de Volhard (IDF, 1979).

3.2.2.7 Teor de Cinzas

O teor de cinzas foi determinado utilizando-se o método recomendado pela AOAC (1995)

3.2.3 Análises microbiológicas

Determinação de coliformes termotolerantes (45°C)

A contagem foi realizada utilizando-se a técnica do Número Mais Provável-NMP— de três tubos, segundo recomendação da American Public Health Association -APHA (KORNACKI;JOHNSON,2001), inoculando-se as diluições da amostra em caldo Lauryl Sulfate Tryptose (Merck)- LST. As culturas dos tubos com resultados presuntivo positivo (produção de gás) após 24 e 48h de incubação a 35°C foram transferidas para o caldo Escherichia Coli (Merck) -EC e incubados a 45°C para a confirmação da presença de coliformes termotolerantes.

3.2.3.2 Determinação de estafilococos coagulase positiva e negativa

A determinação foi realizada utilizando-se o método recomendado pela APHA (BENNET; LANCETTE, 2001). As diluições das amostras foram semeadas na superfície do ágar Baird Parker –BP (Difco) e as placas foram incubadas a 35°C por 48h. Procedeu-se uma contagem presuntiva das Unidades Formadoras de Colônias-UFC.

Cinco colônias suspeitas de cada placa foram selecionadas e transferidas para ágar BHI, seguido de incubação a 35°C por 24h para confirmação, através da caracterização morfológica por coloração de Gram e dos testes bioquímicos de catalase e coagulase.

3.2.3.3 Detecção de *Salmonella* spp

A determinação de *Salmonella* foi realizada segundo recomendação da APHA (ANDREWS et al., 2001). Cada unidade de 25g de amostra foi homogeneizada com 225ml de Caldo Lactosado (Oxoid)- CL durante 2 minutos, permanecendo à temperatura ambiente por 60 minutos com controle e ajuste do pH ($6,8 \pm 0,2$), quando necessário. Após incubação por 24h a 35°C, 0,1 e 1,0 ml do caldo lactosado foi transferido para 10ml de caldo Rappaport-Vassiliardis (Oxoid)- RV, incubado a 42°C e 10 ml de Caldo Tetracionato (Oxoid)- TT, incubado a 43°C, respectivamente, ambos em banho-maria. Uma alçada destes caldos foram estriados em ágar Xylose Lysine Desoxycholate (Merck)- XLD, ágar Bismuto Sulfito (Difco)- BS e ágar Hektoen Enteric (Oxoid)- HE e incubados a 35°C por 24h.

De duas a cinco colônias típicas foram isoladas de cada placa de ágar HE (colônias verde azuladas, com ou sem centro negro), de BS (colônias pretas, cinzas e marrons) e de XLD (colônias róseo escuro, com ou sem centro preto), sendo transferidas para o TSI e LIA, os quais foram incubados a 35°C/24h.

Os isolados, com reações características de *Salmonella* no TSI ou LIA, foram submetidos ao teste de aglutinação com antisoro *Salmonella* polivalente somático. Os

isolados com resultado positivo no teste de aglutinação foram transferidos para o caldo uréia, e as culturas urease negativas foram mantidas em ágar Triptona de Soja (Oxoid)-TSA para a realização da sua identificação com o auxílio do kit de identificação rápido API 20 E (Biomerieux®), conforme instrução do fabricante.

3.2.3.4 Detecção de *Listeria monocytogenes*:

As análises foram realizadas segundo o método recomendado pelo Canadian Health Product and Food Branch (PAGOTTO et al., 2001). Cada unidade de 25 g de amostra foi homogeneizada com 225 ml de caldo LEB em stomacher e incubada a 30°C. Após 24h e 48h de incubação, 0,1 ml do caldo LEB foi inoculado em 10 ml de caldo Fraiser Modificado (Difco)-MFB, sendo incubado a 35°C/48h. Os tubos positivos de MFB (coloração escura) de 24 e 48h, assim como os tubos negativos (sem escurecimento), foram semeados por estrias em ágar MOX e LPM, sendo as placas incubadas a 35 e 30°C por 48h, respectivamente.

Cinco colônias típicas de cada placa de ágar Cloreto de Lítio Feniletanol Moxalactam (Difco), suplementado com 20 mg/l de moxalactam (Sigma)- LPM (colônias azul esverdeado sob luz transmitida), e de ágar Oxoid (Oxoid), suplementado com suplemento seletivo (Oxoid) -OXA (colônias pretas com halo escuro), foram purificadas e mantidas em TSA-YE até sua identificação.

A identificação foi realizada através de caracterização morfológica (coloração de gram), e bioquímica pelos testes de produção de catalase, β hemólise em ágar sangue de cavalo, motilidade a 25°C em meio SIM e produção de ácido a partir da utilização da ramnose, manitol e xilose. O kit API Listeria (Biomerieux®) também foi utilizado para identificação de alguns isolados, sendo este utilizado conforme instruções do fabricante.

3.2.3.5 Determinação de bolores e leveduras:

A determinação de bolores e leveduras foi realizada conforme metodologia recomendada pela APHA (BEUCHAT; COUSIN, 2001) em que 0,1 ml das diluições seriadas foram semeadas na superfície do ágar Dicloran Rosa de Bengala Cloranfenicol (Oxoid)-DRBC, suplementado com cloranfenicol suplemento seletivo (Oxoid), e incubadas a 25°C por 5 dias. Posteriormente, realizou-se a contagem das Unidades Formadoras de Colônias-UFC/g.

3.2.3.6 Determinação de *Bacillus cereus* mesófilo e psicrotrófico:

A determinação desses microrganismos foi realizada utilizando-se o método recomendado pela APHA (BENNETT; BELAY, 2001).

As diluições decimais foram inoculadas na superfície do ágar Manitol-Gema de Ovo-Polimixina (Difco)- MYP e incubadas a 30°C por 24h (para verificação de cepas mesófilas) e 7°C por 10 dias (para verificação de cepas psicrotróficas). Após contagem das UFC de colônias típicas, cinco ou mais colônias foram estriadas em ágar nutriente e incubadas a 30°C por 24h, para confirmação e identificação através da coloração de gram, reação de catalase, fermentação anaeróbia da glicose, decomposição da tirosina, resistência a lisozima, teste de motilidade, crescimento rizóide, atividade hemolítica e detecção de cristais de toxinas, esta realizada segundo metodologia descrita por SHARIF e ALAEDDINOGLU (1998).

3.2.4 Avaliação de características de patogenicidade

3.2.4.1 Detecção de enterotoxina estafilocócica pré formada nas ricotas comerciais:

Foram analisados 20 gramas de ricota utilizando-se o sistema automatizado mini-VIDAS (Biomérieux®), conforme instrução do fabricante, disponibilizado pelo

Laboratório de Toxinas Microbianas do Departamento de Ciências de Alimentos – FEA – UNICAMP. O Sistema utiliza a metodologia ELFA (Enzyme Linked Fluorescent Assay), um ensaio imunoenzimático, similar ao ELISA (Enzyme Linked Immuno Assay), apresentando como diferença o substrato (4 MUP) 4 METIL UMBELIFERIL FOSFATO que, após ser hidrolisado pela enzima fosfatase alcalina, se transforma em umbeliferona, emitindo fluorescência a 450 nm quando excitadas a 370 nm. A intensidade de fluorescência liberada é medida e determinado o resultado, permitindo a detecção de enterotoxinas de estafilococos (SEA, SEB, SEC_{1,2,3}, SED e SEE) (APÊNDICE B).

3.2.4.2 Avaliação da capacidade de produção de enterotoxinas pelas linhagens de estafilococos coagulase positiva e negativa isoladas das ricotas comerciais:

Antes da realização dos testes para avaliação da capacidade de produção de enterotoxinas nas culturas, foi realizado o teste da Furazolidona, segundo Rheinbaben e Hadlok (1981), para diferenciação de estafilococos e micrococcos.

Para o teste de avaliação da capacidade de produção de enterotoxinas em meio de cultura líquido, as cepas de estafilococos foram ativadas em caldo BHI a 35°C por 24 h, de onde foi retirada uma alíquota de 2ml e adicionado a 200ml de caldo tripticase de soja (TSB), incubando-se em estufa com agitação a 36°C por 48h (NETO et al., 2002; CHOU e CHEN, 1997). A cultura foi então centrifugada a 3000 rpm por 15min à temperatura de 4°C e uma alíquota de 500ul do sobrenadante foi retirada e submetida ao teste do kit ViDAS SET “Staph enterotoxin”, conforme instruções do fabricante.

3.2.4.3 Detecção da produção de enterotoxina diarréica por cepas de *Bacillus cereus*

Quarenta e dois isolados, com perfil clássico de *B. cereus* frente aos testes bioquímicos e morfológicos de identificação, representando no mínimo 3 isolados de cada marca comercial com contagem, foram avaliados quanto à produção de enterotoxinas. Uma cepa padrão (*B. cereus* ATCC 14579) foi utilizada como controle.

Antes do início dos testes, os isolados foram ativados por estrias em ágar infusão de cérebro e coração (BHI) e incubados a 30°C durante 24h.

Para a detecção da produção de enterotoxinas foi utilizado o Kit *Bacillus Diarrhoeal Visual Immunoassay* (kit BDE-VIA, lote 14205012 ;Tecra, Roseville New South Wales, Austrália). O teste detecta a proteína 45 kDa do complexo NHE, através do teste ELISA (**APÊNDICE C**). Uma alçada da cultura proveniente do ágar BHI foi inoculada em 10 ml de caldo BHI, suplementado com 0,1% de glicose, e incubado por 30°C durante 18 horas. O teste foi realizado conforme instruções do fabricante. Os isolados psicotróficos foram testados tanto a 30° C por 18 h quanto a 7 °C por 10 dias.

3.2.4.4 Avaliação dos genes que codificam os complexos HBL e NHE de *Bacillus cereus*:

Para determinar a presença dos genes que codificam os complexos HBL e NHE utilizou-se a técnica da PCR (Reação em cadeia da polimerase). Os primers (iniciadores) utilizados para a amplificação dos genes associados a produção de enterotoxinas estão listados na **Tabela 4**.

3.2.4.4.1 Extração do DNA (KABUKI et al., 2005)

Uma alçada da cultura proveniente do agar BHI foi inoculado em 10 ml de caldo BHI suplementado com 1% de glicose e incubado a 32 °C durante 18 horas sob agitação a 200 rpm. Uma alíquota de 250 ul deste caldo foi transferida para um tubo Eppendorf® e centrifugada a 13000xg/10min. O sobrenadante foi descartado e ao pellet depositado no fundo do tubo foram adicionados 100 ul de tampão TE (Tris, EDTA) pH 7, 5 (Invitrogen®). As células bacterianas foram então lisadas através da incubação a 100°C por 10 minutos e o DNA foi separado por centrifugação a 13.000xg por 3 min. O sobrenadante com o DNA bacteriano foi estocado a -20°C.

3.2.4.4.2 Reação em cadeia da Polimerase

A amplificação do DNA foi realizada em termociclador Mastercycler epgradients 534 (Eppendorf) utilizando-se 35 ciclos de desnaturação a 94 °C por 45 s, anelamento a 50-55° C por 45 s e extensão a 72 °C por 1 min. Para cada reação de amplificação foi

preparado um volume total de 24 ul, contendo 0,2 ul da enzima Taq polimerase(1U/ul); 2,5 ul de tampão 10 X(200mM Tris-HCl- pH 8,0; 500 mM de KCl); 1,5 ul de MgCl₂ 25 mM ; 0,5 ul de dNTPs 10 mM; 1 ul (12,5 mM) de cada um dos primers, 1 ul do DNA extraído e água Mli-Q esterelizada (q.s.p 24 ul) (KABUKI et al., 2005).

Os produtos da PCR foram visualizados em gel de agarose a 2,0% através do sistema de eletroforese horizontal submersa, utilizando o corante Syber Safe® por 15 minutos para visualização do produto da PCR pela UV transiluminação. Marcadores de peso molecular foram incluídos em cada gel (100bp DNA ladder; Invitrogen).

Tabela 4. Primers utilizados para a caracterização de isolados de *B. cereus*.

Gene	Seqüência (5`-3`)	Produto (bp)	Referência
HblA	CTG CAG ATG TTG ATG CCG AT ATG CCA CTG GGA CAT AT	300	Hansen; Hendriksen, 2001.
HblD	AAT CAA CAG CTG TCA CGA AT CAC CAA TTG ACC ATG CTA AT	410	Hansen; Hendriksen, 2001.
HblC	AAT GGT CAT CGG AAC TCT AT CTC GCT GTT CTG CTG TTA AT	730	Hansen; Hendriksen, 2001.
NheA	TAC GCT AAG GAG GGG CA GTT TTT ATT GCT TCA TCG GCT	479	Granum et al., 1999;
NheB	CTA TCA GCA CTT ATG GCA G ACT CCT AGC GGT GTT CC	753	Granum et al., 1999;
NheC	CGG TAG TGA TTG CTG GG CAG CAT TCG TAC TTG CCA A	563	Granum et al., 1999;

3.2.4.5 Subtipagem das culturas isoladas de *L. monocytogenes*

Dos 135 isolados de *Listeria sp* provenientes dos meios de cultura (OXA e LPM), treze anteriormente identificadas como *L. monocytogenes* pelo kit API Listeria foram subtipadas utilizando-se a análise alélica dos genes de virulência *actA* e *hly*. O polimorfismo alélico da *actA* foi verificado por PCR e *hly-A* por PCR-RFLP (Polimorfismo do comprimento do fragmento de restrição) utilizando as enzimas de restrição HhaI e HpaII (WIELDMAN et al., 1997).

3.2.4.5.1 Extração do DNA

Os isolados de *L. monocytogenes* foram ativados por estrias em ágar infusão de cérebro e coração (BHI) e incubados a 35°C por 24 horas. Uma colônia foi então inoculada em 5ml de caldo BHI e incubada a 37°C sob agitação a 250 rpm por 18 h. Duzentos e cinquenta µl desta cultura foram então centrifugados a 13.000 x g por 10min. O sobrenadante foi desprezado e as células ressuspensas em 95 µl de 1x tampão PCR, tratadas com 4 µl de lisozima ([50mg/ml]) a temperatura ambiente por 15 min e então digeridas com 1µl de proteinase K ([20mg/l]) a 60°C por 60 min, seguida de fervura por 8 min. Em seguida, fez-se a centrifugação a 13.000 x g por 5 segundos e então após a lise celular, procedeu-se à técnica de PCR.

3.2.4.5.2 Reação em Cadeia da Polimerase

Os primers utilizados estão relacionados na **Tabela 5**.

A amplificação do DNA foi realizada em termociclador Mastercycler epgradients 534 (Eppendorf) utilizando-se um ciclo inicial a 94°C/2min; 35 ciclos de desnaturação a 94 °C por 1 min, anelamento a 50 °C por 1min e extensão a 72°C por 1min e ciclo final a 72°C/5min. Para cada reação de amplificação foi preparado um volume total de 49 µl contendo 0,4 µl da enzima Taq-polimerase(1U/µl); 5,0 µl de tampão 10 X (200mM Tris-HCl- pH 8,0; 500 mM de KCl); 3,0 µl de MgCl₂ 25 mM; 2,5 µl de dNTPs 10 mM; 2 µl (12,5 mM) de cada um dos primers, 1 µl do DNA extraído e água Mli-Q esterilizada (q.s.p 49 µl). Os produtos da PCR foram visualizados em gel de agarose a 1,5%, utilizando-se o corante Syber Safe® por 15 minutos para visualização do produto da PCR pela transiluminação UV. Marcadores de peso molecular foram incluídos em cada gel (1 Kb DNA ladder; Invitrogen). Os tipos alélicos 3 e 4 foram determinados baseando-se nos diferentes tamanhos dos produtos da PCR.

3.2.4.5.3 Reação em cadeia da Polimerase com Polimorfismo do comprimento do fragmento de restrição para *hlyA*

A reação de PCR-RFLP foi realizada primeiramente detectando o gene *hlyA*.

Para cada reação de amplificação foi preparado um volume total de 49 µl, contendo 0,4 µl da enzima Taq-platinum polimerase; 5,0 µl da tampão 1 X; 3,0 µl de MgCl₂ 25 mM; 2,5 µl de dNTPs (1 mM); 2 µl (12,5 mM) de hly-R e hly-F, 1 µl do DNA extraído e água ultra pura (q.s.p 50 µl). Após verificação da presença do gene *hly* através da eletroforese em gel agarose 1,5%, foi realizada a digestão utilizando-se as enzimas de restrição *HhaI* e *HpaII*, a 37°C/3h em banho maria, resultando em um perfil de DNA e determinando-se as linhagens genéticas (I, II e III) dos isolados conforme WIEDMANN et al. (1997).

Tabela 5. Primers utilizados na subtipagem dos isolados de *L. monocytogenes*.

Gene	Seqüência (5`-3`)	Referência
<i>hlyA</i>	TGC GTT TCA TCT TTA GAA GC AAG CCT GTT TCT ACA TTC TTC A	Wiedmann <i>et al</i> , 1997.
<i>actA</i>	TAA AAG TGC AGG GTT ATT GGA TTA CTG GTA GGC TCG G	Wiedmann <i>et al</i> , 1997.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Avaliação das características físico-químicas de ricotas comercializadas no município de Campinas-SP e da conformidade das informações nutricionais

4.1.1 Características físico-químicas das ricotas

A **Tabela 6** apresenta a composição média das quinze marcas de ricota avaliadas e revela que houve diferença significativa para todos os componentes analisados. O parâmetro que menos variou foi o pH e o de maior variação entre as marcas foram os teores de gordura e umidade.

Os resultados das análises físico-químicas das 45 amostras de ricotas, são apresentados na **Tabela 7** onde pode ser visualizado as diferenças entre os lotes de uma mesma marca. Essa variabilidade em princípio seria função da falta de padronização no processamento por parte das empresas, pela variação na composição e quantidade dos ingredientes, além da inexistência, na legislação brasileira, de um Padrão de Identidade e Qualidade (PIQ) específico para ricota.

4.1.2 Teor de Umidade:

Os teores de umidade das amostras de ricotas, conforme **Tabela 7**, variaram de 58,49 a 77,45%. A partir destes dados, e segundo a Portaria nº 146/96 do MAARA (Brasil, 1996), todas as amostras de ricota analisadas receberiam a classificação de queijo de “muita alta umidade” por apresentar teor de umidade acima de 55%.

A análise comparativa entre as diversas marcas mostra que os valores de umidade encontrados apresentaram diferença significativa ($p < 0,05$) entre si (**Tabela 6**).

Estes resultados não diferem muito daqueles apresentados por Souza et al. (2000) que ao avaliarem 30 amostras de ricotas, de cinco marcas diferentes, comercializadas na cidade de Belo Horizonte-MG, mostraram que 93,34% das amostras se enquadrariam na classificação de queijo de muita alta umidade e apenas 3,33% como queijo de “média umidade” e 3,33% de “alta umidade”.

Tabela 6. Composição média das três amostras de quinze marcas comerciais de ricota

Marca	Umidade (%)	Gordura (%)	Gordura base seca (%)	Proteína total (%)	Sal (%)	S/U ¹	Cinzas (%)	Acidez titulável (%ac.láctico)	pH
A	69,68 ^{ecd}	13,28 ^{fe}	43,72 ^{ed}	13,17 ^{ba}	0,20 ^f	0,29 ^{fhg}	0,59 ^g	0,25 ^{de}	5,07 ^{figh}
B	77,08 ^a	5,89 ^h	25,70 ^g	10,99 ^{edc}	1,21 ^a	1,6 ^a	2,48 ^{cd}	0,22 ^{de}	6,26 ^a
C	68,62 ^{edf}	16,83 ^{dc}	53,95 ^{cb}	10,90 ^{edc}	0,18 ^f	0,26 ^{hg}	0,84 ^g	0,30 ^{de}	5,91 ^{bac}
D	74,57 ^{ab}	8,30 ^h	32,59 ^{fg}	12,85 ^{ba}	0,31 ^{ed}	0,41 ^{feg}	0,94 ^{gf}	0,21 ^{de}	5,96 ^{bac}
E	62,22 ^h	17,94 ^{dc}	47,36 ^{ced}	13,73 ^a	0,19 ^f	0,30 ^{fhg}	2,13 ^{cbd}	0,33 ^{cde}	5,75 ^{bdec}
F	62,79 ^h	18,61 ^{bc}	50,06 ^{cbd}	12,61 ^{bac}	0,41 ^d	0,65 ^{dc}	1,29 ^{gfed}	0,30 ^{de}	5,84 ^{bdc}
G	72,07 ^{bc}	12,00 ^f	43,36 ^{ed}	10,01 ^{edf}	0,31 ^{ed}	0,43 ^{fe}	2,72 ^b	0,54 ^{cb}	5,46 ^{fde}
H	67,73 ^{efg}	13,05 ^{fe}	39,60 ^{fe}	13,25 ^a	0,26 ^{ef}	0,39 ^{feg}	1,79 ^{cfed}	0,30 ^{de}	6,03 ^{ba}
I	63,13 ^h	21,55 ^{ba}	58,20 ^b	12,54 ^{bac}	0,88 ^b	1,40 ^b	1,79 ^{ced}	0,30 ^{de}	5,86 ^{bdac}
J	76,15 ^a	7,44 ^h	31,23 ^{fg}	10,59 ^{ed}	0,39 ^d	0,50 ^{de}	2,43 ^{cb}	0,40 ^{cd}	5,61 ^{dec}
K	72,44 ^{bc}	13,72 ^{fe}	49,73 ^{cbd}	9,67 ^{ef}	0,19 ^f	0,27 ^{hg}	1,06 ^{gfe}	0,63 ^b	4,95 ^h
L	74,32 ^{ba}	11,61 ^{fg}	45,10 ^{ed}	11,49 ^{bdc}	0,17 ^f	0,24 ^h	0,56 ^g	0,18 ^{de}	5,91 ^{bac}
M	66,47 ^{fg}	15,11 ^{de}	45,42 ^{ced}	10,93 ^{edc}	0,54 ^c	0,80 ^c	2,97 ^b	0,63 ^b	5,37 ^{feg}
N	65,17 ^{hg}	24,22 ^a	69,79 ^a	8,78 ^f	0,20 ^{ef}	0,31 ^{feg}	0,46 ^g	0,14 ^e	5,41 ^{feg}
O	71,62 ^{bcd}	8,83 ^{hg}	31,02 ^g	10,94 ^{edc}	0,22 ^{ef}	0,30 ^{fhg}	3,84 ^a	0,98 ^a	5,03 ^{hg}

Médias com letras em comum na mesma coluna não diferem entre si significativamente (p >0,05), segundo o teste de Tukey.

¹ Relação Sal/umidade

Tabela 7 Composição físico-química das 45 amostras de ricotas

Amostra	proteína	Gordura base seca	Umidade	Gordura	Cinzas	Sal	Acidez titulável	Sal/Umidade	pH
	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	
A1	12,6	47,90	68,74	15,00	0,47	0,23	0,19	0,33	5,12
A2	13,84	40,32	70,23	12,00	0,56	0,20	0,31	0,29	4,67
A3	13,05	42,95	70,05	12,83	0,73	0,19	0,26	0,27	5,47
B1	11,64	24,28	77,45	5,50	2,53	1,26	0,27	1,62	6,23
B2	10,37	28,33	77,01	6,50	2,30	1,27	0,24	1,65	6,48
B3	10,98	24,48	76,84	5,67	2,62	1,24	0,16	1,62	6,08
C1	10,93	48,47	66,38	16,50	0,71	0,23	0,26	0,35	6,36
C2	10,25	50,45	71,24	14,50	0,84	0,14	0,37	0,19	5,96
C3	11,51	62,91	68,98	19,50	0,97	0,20	0,28	0,30	5,43
D1	12,39	35,32	74,27	9,23	0,62	0,23	0,19	0,31	5,76
D2	12,53	31,76	74,33	8,17	0,96	0,33	0,22	0,44	6,19
D3	13,64	30,71	75,53	7,50	1,23	0,41	0,22	0,55	5,93
E1	13,48	43,95	64,84	15,50	2,11	0,25	0,47	0,39	5,94
E2	14,75	48,00	62,47	18,00	1,92	0,17	0,28	0,27	5,97
E3	12,97	50,13	59,48	20,33	2,35	0,18	0,35	0,31	5,36
F1	12,23	50,15	64,18	18,00	1,42	0,40	0,43	0,62	5,92
F2	12,46	49,14	60,41	19,50	1,14	0,47	0,23	0,78	5,54
F3	13,14	50,89	64,10	18,33	1,31	0,40	0,25	0,62	5,39
G1	9,68	42,36	71,76	11,83	2,60	0,32	0,83	0,45	5,20
G2	10,51	41,10	71,42	11,67	2,75	0,37	0,29	0,52	5,81
G3	9,85	46,63	72,28	12,50	2,80	0,26	0,50	0,36	6,15

H1	14,54	47,22	64,06	17,00	1,60	0,21	0,35	0,33	6,14
H2	12,63	39,14	69,34	12,00	1,72	0,35	0,30	0,51	5,94
H3	12,60	33,34	69,73	10,17	2,04	0,26	0,24	0,37	6,01
I1	10,17	58,71	64,28	21,00	1,79	0,98	0,40	1,53	5,92
I2	16,35	56,11	62,49	21,00	1,64	0,75	0,28	1,20	5,62
I3	11,10	59,81	62,15	22,67	1,96	1,04	0,24	1,67	6,05
J1	9,52	28,75	76,63	6,67	2,56	0,40	0,18	0,53	6,29
J2	11,27	35,13	75,19	8,67	2,71	0,43	0,35	0,57	5,37
J3	10,98	29,79	76,55	7,00	2,02	0,38	0,67	0,50	5,19
K1	9,56	51,72	72,35	14,33	0,61	0,22	0,41	0,31	6,07
K2	10,00	52,48	71,38	15,00	0,98	0,20	0,64	0,27	4,91
K3	9,47	45,00	73,65	11,83	1,59	0,25	0,85	0,34	4,83
L1	10,09	44,49	73,09	12,00	0,52	0,20	0,19	0,27	5,10
L2	13,61	45,71	74,97	11,50	0,55	0,09	0,16	0,12	5,90
L3	10,76	45,11	74,50	11,33	0,62	0,25	0,19	0,34	5,77
M1	10,62	44,31	65,12	15,50	3,02	0,54	0,53	0,84	5,70
M2	12,00	42,13	68,60	16,50	2,98	0,63	0,59	0,92	5,39
M3	10,16	49,81	66,69	16,50	2,91	0,51	0,78	0,76	5,03
N1	8,84	65,53	64,87	23,00	0,52	0,17	0,17	0,26	5,63
N2	9,27	74,64	64,12	26,67	0,41	0,17	0,13	0,26	5,25
N3	8,22	69,21	66,77	23,00	0,44	0,29	0,13	0,43	5,37
O1	9,42	50,51	71,10	14,50	1,22	0,37	0,66	0,52	4,90
O2	11,15	22,96	71,47	6,50	5,07	0,17	1,04	0,24	5,19
O3	12,25	19,59	72,09	5,50	5,24	0,14	1,25	0,19	5,00

4.1.3 Teor de Gordura:

Os teores de gordura nas amostras de ricotas avaliadas variaram ainda mais que os teores de umidade, observando-se valores da ordem de 5,50 a 26,67% (**Tabela 7**).

Considerando-se o conteúdo de matéria gorda no extrato seco, segundo a classificação para queijos em geral estabelecida pela Portaria nº 146/96 do MAARA (Brasil, 1996), a distribuição das amostras neste trabalho seria a seguinte 8,89% (4/45) queijo magro, 42,22% (19/45) queijo semi-gordo; 40,00% (18/30) queijo gordo e 8,89% (4/45) - queijo extra gordo, conforme mostra a **Figura 1**.

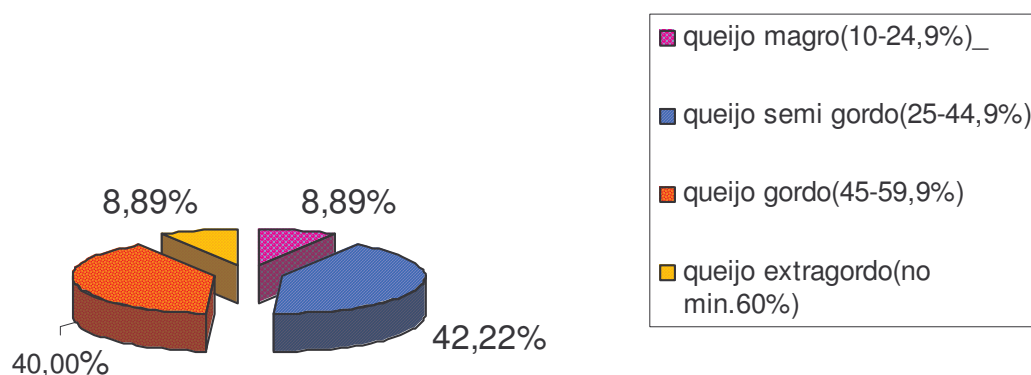


Figura 1. Classificação das amostras de ricota em relação ao teor de gordura (extrato seco), segundo a Portaria nº 146/96 do MAARA (Brasil, 1996).

A variabilidade do teor de gordura em ricotas também foi verificado por Souza et al. (2000) que do total de 30 amostras, classificaram 16,7% das ricotas como “queijo magro”, 23,3% como “queijo semi-gordo” e 60,0% “queijo gordo”.

Souza et al. (2002) avaliaram 20 amostras de queijo Minas frescal, destas, 35% (7/20) e 65%(13/20) foram classificadas como queijo semi-gordo e queijo gordo respectivamente.

Estes dados com tamanha variação podem ser atribuídos, principalmente, à porcentagem de leite adicionado ao soro, visando melhorar o rendimento, o sabor e a textura da ricota além, da ausência de padronização do teor de gordura no leite.

A disposição à venda de produtos como a ricota, apresentando uma variação tão elevada na sua composição é preocupante, pois a ricota normalmente é apresentada e associada a produtos de baixo teor de gordura, sendo mais utilizada por pessoas com restrição alimentar (dietas hipocalóricas, doenças cardiovasculares, colesterol e triglicérides elevados).

4.1.4 Teor de proteínas

Um dos principais componentes da ricota, são as proteínas cujos resultados revelam uma grande variação (8,84 a 16,35 %). Esta variação está provavelmente, associada à porcentagem de leite adicionado ao soro. Segundo Guinnee et al. (1993) o teor de proteína da ricota variaria de 11,5 a 12%.

4.1.5 Teor de sal

Houve grande variação no valor de sal (0,14 a 1,27 %). A literatura indica valores de 0,2% à ausência de sal neste tipo de queijo (FOX, 2000; KOSIKOWSKI, MISTRY, 1999).

Os valores de sal acima do esperado, provavelmente, seja devido, em alguns casos, à presença de outros tipos de sais, além do cloreto de sódio, como o cloreto de cálcio que é utilizado como agente de firmeza por algumas empresas produtoras

4.1.6 .Teor de cinzas:

Cinza de um alimento é o resíduo inorgânico que permanece após a queima da matéria orgânica, que é transformada em CO_2 , H_2O , NO_2 . A cinza é constituída principalmente de grandes quantidades de K, Na, Ca e Mg; pequenas quantidades de Al, Fe, Cu, Mn e Zn; traços de Ar, I e F e outros, dependendo da natureza do alimento. Os produtos lácteos são ricos em, Ca e P. O conteúdo de cinzas totais nos produtos lácteos varia de 0,7% a 6,0% (CHECCHI, 2003). Sua determinação é necessária, para o cálculo do teor de carboidratos, por diferença. O teor de cinza das amostras de ricotas avaliadas variou de 0,41 a 5,24 %.

4.1.7 Acidez titulável e pH:

A acidez titulável apresentou grande variação. O maior teor de acidez titulável (1,25%) foi o da amostra O3, com pH 5,00, o menor teor de acidez foi o da amostra N2 e N3 com teor de acidez de 0,13% e pH 5,25 e 5,37, respectivamente. O pH e o teor de acidez titulável via de regra se correlacionam, de forma inversa, fato este que não foi observado na comparação entre os dados das 45 amostras ($R < 0,5$). Há amostras com acidez alta e pH não tão baixo, fato este talvez justificado para algumas amostras, pela adição de cloreto de cálcio, que pode ter aumentado a acidez aparente e por efeito tampão não ter alterado significativamente o pH.

Carvalho (2003) analisando queijos Minas frescal, observou valores de pH variando de 4,93 a 6,45 para queijos produzidos por acidificação direta, pH de 5,07 a 6,33 para queijos produzidos por adição de cultura láctica e, para queijos produzidos por ultrafiltração, variação de 6,35 a 6,70.

4.1.8 Conformidade de algumas informações nutricionais declaradas na rotulagem com a legislação.

A conformidade da informação nutricional declarada nos rótulos das quinze marcas de ricotas com o estabelecido pela Resolução da Diretoria Colegiada RDC nº 360/2003 da ANVISA (BRASIL, 2003a) foi avaliada bem como a variação entre os valores declarados e aqueles obtidos por análises laboratoriais.

Segundo a Resolução RDC nº 360/2003, a informação nutricional contida no rótulo deve conter, obrigatoriamente o valor energético total e a quantidade de: carboidratos, proteínas, gordura total, gordura saturada, gordura trans, fibra alimentar e sódio. Além dos itens obrigatórios, outros nutrientes podem ser declarados opcionalmente, tais como vitaminas e sais minerais, desde que estejam presentes em pelo menos 5% da Ingestão Diária Recomendada (IDR), por porção do alimento indicada no rótulo.

A Resolução RDC nº 360/2003 orienta também como deve ser realizado o cálculo para obtenção do valor calórico de carboidratos e de proteínas. De acordo com

esta resolução, a informação nutricional do rótulo de um alimento deve apresentar o conteúdo dos seus componentes e a declaração da porcentagem do Valor Diário (% VD) baseados em uma ingestão diária pré-definida para cada nutriente e considerando uma dieta de 2000 kcal. Apenas 1 marca se adequou (marca B). As demais, mantendo o valor de referência de 2500 Kcal estabelecida pela RDC nº 40 (Brasil, 2001), revogada pela RDC nº 360/2003 (BRASIL, 2003a). As empresas têm o prazo até 31 de julho de 2006 para se adequarem à RDC nº 360/2003.

Um importante ponto que não é abordado claramente na Resolução RDC nº 360/2003 é a obtenção dos dados analíticos. Não há menção se os dados podem ser obtidos por meio de valores médios de dados de análise do produto ou por tabelas e bancos de dados de composição de alimentos nacionais ou internacionais, conforme orientava o regulamento anterior, a RDC nº 40/2001 (BRASIL, 2001b).

Tendo como referência a RDC nº 360/2003 em vigor, que permite uma variação de nutrientes com limite de tolerância de $\pm 20\%$, foram analisados o teor de gordura, proteína e valor energético total (**Tabela 8**). As análises de gordura mostraram que 66,67% (10/15) dos valores rotulados estavam em desacordo com a legislação, sendo 20% (3/15) com valores acima do limite superior e 46,67% (7/15) abaixo da faixa de tolerância permitida.

Para os teores de proteína, 60% (9/15) estavam fora da variação de $\pm 20\%$, sendo que 53,3% (8/15) apresentavam valores abaixo do limite inferior e 6,70% (1/15) apresentaram valores acima do limite superior.

Em relação ao valor energético total, 60% (9/15) das amostras estavam fora da faixa de variação permitida, sendo 20% (3/15) acima do limite superior e 40% (6/15) abaixo do limite inferior.

Os resultados revelam o não cumprimento da legislação relativa à informação nutricional bem como o conseqüente prejuízo do consumidor que adquire, em geral, produtos cujos rótulos apresentam informações com variação superior ou inferior a 20% ao valor declarado, e a necessidade de uma maior fiscalização por parte dos órgãos governamentais.

Tabela 8. Distribuição das marcas em função das diferenças entre valores experimentais e declarados nos rótulos de ricotas

Informação nutricional	Amostras dentro da variação permitida ^a ($\pm 20\%$)	Amostras com valores abaixo do limite inferior	Amostras com valores acima do limite superior
Proteína	6	8	1
Gordura	5	7	3
Valor Energético	6	6	3
Total			

^a: a variação permitida de $\pm 20\%$ é estabelecida na Resolução RDC nº 360/2003.

4.2 Avaliação da Qualidade Microbiológica de Ricotas

4.2.1 Conformidade com os Padrões Legais

As amostras de ricota comerciais foram submetidas às análises microbiológicas segundo os padrões estabelecidos pela Resolução RDC 12/2001 da ANVISA (BRASIL, 2001), complementados pela avaliação de *B. cereus*, bolores e leveduras.

A partir dos resultados experimentais apresentados no item 4.1.2, deste trabalho, onde a totalidade das amostras de ricota foi classificada como “queijo de muita alta umidade ($\geq 55\%$)”, foram utilizados os critérios microbiológicos descritos no **Tabela 9**.

Tabela 9. Padrões microbiológicos para queijo de muita alta umidade

Parâmetros	Critérios
Coliformes a 45°C	5×10^2 UFC ou NMP/g
Estafilococos coagulase positiva / g	5×10^2 UFC ou NMP/g
<i>Salmonella sp</i>	Ausência em 25g
<i>Listeria monocytogenes</i>	Ausência em 25g

Fonte: Resolução RDC 12/2001 (Brasil, 2001)

Os resultados das análises microbiológicas das ricotas, segundo os padrões estabelecidos pela RDC 12/2001 são apresentados na **Tabela 10**, onde são destacadas as amostras nas quais foram obtidos valores em desacordo com o padrão estabelecido.

Do total de 45 amostras avaliadas, conforme mostra a **Figura 2**, 46,7% (21/45) apresentaram-se em desacordo com o padrão regulamentar vigente e em todas os limites máximos permitidos para coliformes termotolerantes foram superados. Apenas **2,2% (1/45)** das amostras apresentaram contagens de estafilococos coagulase positiva acima do limite e em **6,7% (3/45)** foi observada a presença de *Listeria monocytogenes*. No entanto, em nenhuma amostra foi detectada a presença de *Salmonella*.

Em relação às empresas processadoras, 60,0% (9/15) apresentaram produtos em desacordo. Dentre elas, apenas uma empresa se caracterizou por apresentar uma amostra fora do padrão para estafilococos coagulase positiva e duas outras empresas por apresentarem amostras com presença de *Listeria monocytogenes*.

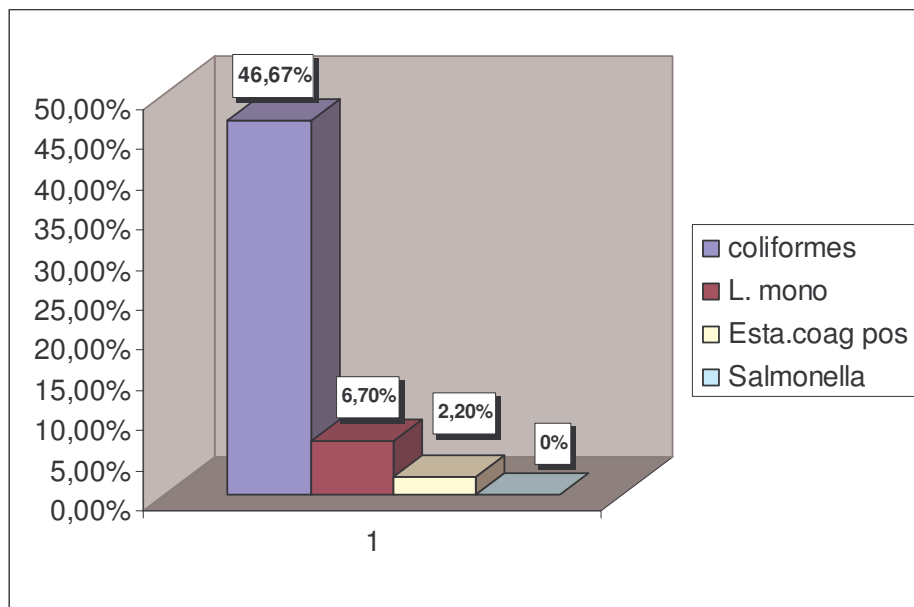


Figura 2. Porcentagem de amostras em desacordo com os limites estabelecidos pela Resolução RDC 12/2001.

Tabela 10. Avaliação microbiológica de ricotas comerciais de acordo com os padrões da Resolução RDC nº 12/2001.

Amostra	Estafilococos coagulase positiva (UFC/g)	Coliformes termotolerantes (NMP/g)	<i>Listeria</i> <i>monocytogenes</i> em 25 g	<i>Salmonella</i> em 25 g
A1	$< 10^2$	< 3	Ausência	Ausência
A2	$< 10^2$	< 3	Ausência	Ausência
A3	$2,8 \times 10^2$	< 3	Ausência	Ausência
B1	$< 10^2$	< 3	Ausência	Ausência
B2	$< 10^2$	4,3	Ausência	Ausência
B3	$< 10^2$	< 3	Ausência	Ausência
C1	$< 10^2$	< 3	Ausência	Ausência
C2	$< 10^2$	< 3	Ausência	Ausência
C3	$< 10^2$	< 3	Ausência	Ausência
D1	$< 10^2$	< 3	Ausência	Ausência
D2	$< 10^2$	< 3	Ausência	Ausência
D3	$< 10^2$	< 3	Ausência	Ausência
E1	$< 10^2$	$4,6 \times 10^3$	Ausência	Ausência
E2	$< 10^2$	$2,4 \times 10^4$	Ausência	Ausência
E3	$< 10^2$	$2,4 \times 10^4$	Ausência	Ausência
F1	$< 10^2$	< 3	Ausência	Ausência
F2	$< 10^2$	< 3	Ausência	Ausência
F3	$< 10^2$	4	Ausência	Ausência
G1	$< 10^2$	$2,4 \times 10^4$	Ausência	Ausência
G2	$< 10^2$	$2,4 \times 10^3$	Ausência	Ausência
G3	$< 10^2$	43	Ausência	Ausência
H1	$< 10^2$	$2,4 \times 10^4$	Ausência	Ausência
H2	$< 10^2$	$4,6 \times 10^4$	Ausência	Ausência
H3	$< 10^2$	$2,4 \times 10^3$	Presença	Ausência
I1	$< 10^2$	$2,4 \times 10^4$	Ausência	Ausência
I2	$< 10^2$	$2,4 \times 10^4$	Ausência	Ausência
I3	$< 10^2$	$4,6 \times 10^3$	Ausência	Ausência
J1	$< 10^2$	$2,4 \times 10^4$	Ausência	Ausência
J2	$< 10^2$	$2,4 \times 10^2$	Ausência	Ausência
J3	$< 10^2$	$4,6 \times 10^2$	Ausência	Ausência
K1	$< 10^2$	< 3	Ausência	Ausência
K2	$< 10^2$	$1,1 \times 10^4$	Ausência	Ausência
K3	$< 10^2$	$4,6 \times 10^4$	Ausência	Ausência
L1	$< 10^2$	< 3	Ausência	Ausência
L2	$< 10^2$	< 3	Ausência	Ausência
L3	$< 10^2$	< 3	Ausência	Ausência
M1	$< 10^2$	$2,4 \times 10^4$	Ausência	Ausência
M2	$< 10^2$	$1,1 \times 10^3$	Ausência	Ausência
M3	$< 10^2$	$2,4 \times 10^3$	Ausência	Ausência
N1	$< 10^2$	< 3	Ausência	Ausência
N2	$4,7 \times 10^3$	$4,6 \times 10^3$	Ausência	Ausência
N3	$< 10^2$	< 3	Ausência	Ausência
O1	$< 10^2$	$2,4 \times 10^4$	Presença	Ausência
O2	$< 10^2$	$2,4 \times 10^3$	Ausência	Ausência
O3	$< 10^2$	$4,6 \times 10^3$	Presença	Ausência

4.2.1.1 Coliformes termotolerantes

A presença e o elevado nível de coliformes termotolerantes têm sido relatados em outros trabalhos científicos (ALMEIDA FILHO; NADER FILHO, 2002; CARVALHO, 2003; LOUGUERCIO; ALEIXO, 2001; MENÉNDEZ et al., 2001) envolvendo a produção de queijos a partir de leite cru ou que utilizam tratamentos térmicos mais brandos.

Embora a utilização de leite pasteurizado e a temperatura mais elevada na coagulação da massa (~90°C) utilizada no processamento de ricota criasse a expectativa de produtos com menor grau de contaminação, neste trabalho observou-se uma elevada incidência de coliformes termotolerantes nas amostras, aonde 46,7% (21/45) estavam acima do limite tolerado (5×10^2 NMP/g).

Os resultados aqui obtidos atestam a qualidade insatisfatória das ricotas comercializadas, fato este, já evidenciado anteriormente por Raimundo (2004) que detectou 83,3% de ricotas fora do padrão para coliformes termotolerantes e também por Tebaldi et al. (2005) onde todas as três marcas de ricota se apresentavam fora do padrão legal. Isso evidencia a deficiência nas condições higiênico-sanitárias dos estabelecimentos nacionais envolvidos na produção de ricotas e a necessidade de uma atenção maior com as operações e condições pós-processamento térmico.

4.2.1.1 Estafilococos coagulase positiva

A presença de estafilococos coagulase positiva nas amostras de ricotas foi relativamente baixa (4,4%; 2/45) e apenas uma delas (1/45) fora do padrão legal, com contagem de $4,7 \times 10^3$ UFC/g.

Normano et al. (2005) analisaram 194 amostras de ricotas e destas 24,2 % (47/194) estavam contaminadas com estafilococos coagulase positiva, sendo 6 identificadas como *S. aureus* e 5 destas (83,3%; 5/6) foram produtoras das enterotoxinas SEA e SED. Segundo o autor a contaminação se devia às condições pós-processamento.

4.2.1.3 *Salmonella*

Nas amostras analisadas, apesar dos elevados índices de coliformes termotolerantes, verificou-se ausência de *Salmonella* em 100% (45/45) das amostras.

Estes resultados corroboram com os obtidos por Raimundo (2004) e Cossendu et al. (1997), que não detectaram a presença de *Salmonella spp* nas ricotas analisadas.

Tebaldi et al. (2005) detectaram *Salmonella sp* em uma das três marcas de ricota analisadas, sendo que esta também estava fora do padrão microbiológico para coliformes termotolerantes.

Para sete amostras que apresentaram colônias suspeitas, com reação positiva nos testes bioquímicos preliminares em TSI e LIA, foi realizada identificação das colônias isoladas, através do Kit de identificação rápida API-20E (Biomérieux®) sendo identificado outros gêneros da família Enterobacteriaceae como *Citrobacter*, *Serratia marcescens* e *Escherichia coli*.

Alguns fatores como a possível competição entre as diversas espécies microbianas presente e o estresse gerado durante o processamento e estocagem do produto podem justificar, em parte, o baixo potencial deste alimento para o crescimento de *Salmonella sp*. (ROITMAM apud BARROS et al., 2004).

4.2.1.4 *Listeria monocytogenes*

Das 45 amostras de ricotas analisadas, 20% (9/45) foram positivas para *Listeria sp.*, compreendendo 6 estabelecimentos diferentes.

Foram isoladas 118 cepas típicas de *Listeria sp.* referentes a 9 amostras e dentre as espécies identificadas encontraram-se: *L. monocytogenes* em 6,7% das amostras (3/45), *L. grayi* 2,2% (1/45), *L. innocua* 13,3% (6/45), *L. seeligeri* 2,2%(1/45) e *L. welshimeri* 6,7% (3/45) conforme mostra na **Tabela 11**.

A presença de *L. monocytogenes* em 6,7% das amostras é um fato preocupante, já que este produto é consumido muitas vezes sem qualquer tipo de tratamento térmico, em sanduíches naturais e patês, podendo causar surtos como aqueles descritos por Makino et al. (2005), Linnan et al.(1988) e Gaulin et al. (2003) envolvendo o consumo de produtos lácteos.

Tabela 11- Espécies de *Listeria* isoladas de ricotas e sua distribuição entre as amostras analisadas.

Espécie isolada	Amostras positivas	% de isolados*
<i>L. innocua</i>	F2, H1, H2, H3, K2 e N1 13,3%	92/118 (78,0%)
<i>L. monocytogenes</i>	H3, O1 e O3 6,7%	13/118 (11,0%)
<i>L. welshimeri</i>	F2, H2 e O1 (6,7%)	6/118 (5,1%)
<i>L. grayi</i>	O1 (2,2%)	2/118 (1,7%)
<i>L. seeligeri</i>	B2 (2,2%)	5/118 (4,2%)

- nº de isolados / nº total de isolados de *Listeria*

A presença de outras espécies de *Listeria*, como *L. grayi*, *L. welshimeri*, *L. seeligeri* e *L. innocua*, também é preocupante pois revela que há condições potenciais de instalação e desenvolvimento de *L. monocytogenes* nestes produtos.

Segundo Tompikin (2002) há a necessidade de uma resposta à presença de qualquer espécie de *Listeria* com o mesmo rigor dispensado à *L. monocytogenes* através de procedimentos efetivos de higienização para garantir o controle eficaz desses microrganismos. A contaminação por listeria parece estar relacionada à contaminação ambiental na indústria pela não aplicação de um programa efetivo de boas práticas de manufatura.

Kabuki (2004) rastreou *Listeria* em plantas de produção de queijos frescos, detectando elevada contaminação por *L. monocytogenes* em pisos e drenos, com 30% e 20,6% , respectivamente, de amostras positivas.

Rocha (2004) analisou 120 amostras de superfícies de ambientes e equipamentos de laticínio produtor de queijo Minas frescal, e verificou que 17,5% delas apresentaram resultados positivos para *Listeria*. As seguintes espécies foram encontradas: *L. grayi* (drenos); *L. welshimeri* (piso e bomba de transporte de soro); *L. innocua* (piso e mesa da sala de coagulação e piso da câmara fria) e *L. seeligeri* (dreno, piso, tanque de coagulação e piso da câmara fria).

4.2.2 Avaliação microbiológica complementar

Além dos parâmetros microbiológicos definidos pela Resolução RDC nº12/2001, no presente trabalho pesquisou-se também outros microrganismos que pudessem servir como parâmetro de avaliação das condições higiênicas no processamento de ricota, como os bolores, leveduras e *Bacillus cereus*. Os resultados estão apresentados na **Tabela 12**.

4.2.2.1 Bolores e leveduras

Os resultados da contagem de bolores e leveduras, conforme mostra a **Tabela 12**, revelam além da elevada ocorrência - 47,5%(19/40) das amostras contaminadas por bolores e 97,5% (39/40) por leveduras – o elevado grau de contaminação- (97,5%) das amostras com contagens acima de $2,3 \times 10^3$ UFC/g (**Figura 3 e Figura 4**)

Embora a presença de leveduras possa representar uma contribuição positiva no desenvolvimento do sabor durante a maturação de alguns queijos, em outros, pode atuar negativamente ao favorecer a deterioração, causar produção excessiva de gás, aumentar a acidez, promover mudanças na textura e sabor amargo e de ranço.

Tabela 12 Resultados obtidos nas determinações microbiológicas complementares à Resolução RDC nº12/2001.

Amostra	Contagem (UFC/g)			
	Bolores	Leveduras	<i>B. cereus</i>	Estafilococos coagulase negativa
A1	-	-	$< 10^2$	$< 10^2$
A2	$3,0 \times 10^2$	$2,2 \times 10^5$	$< 10^2$	$< 10^2$
A3	$< 10^2$	$3,8 \times 10^6$	$1,2 \times 10^4$	$< 10^2$
B1	-	-	$< 10^2$	$6,3 \times 10^3$
B2	$4,0 \times 10^2$	$3,0 \times 10^5$	$2,0 \times 10^2$	$< 10^2$
B3	$< 10^2$	$3,7 \times 10^5$	$3,0 \times 10^2$	$< 10^2$
C1	-	-	$5,3 \times 10^5$ ($1,3 \times 10^6$) ^a	$2,2 \times 10^5$
C2	$4,0 \times 10^5$	$1,4 \times 10^6$		$2,5 \times 10^6$
C3	$< 10^2$	$4,1 \times 10^5$		$5,3 \times 10^6$
D1	-	-	$< 10^2$	$< 10^2$
D2	$< 10^2$	$7,5 \times 10^3$	$< 10^2$	$< 10^2$
D3	$< 10^2$	$< 10^2$	$1,0 \times 10^2$	$< 10^2$
E1	-	-	$3,4 \times 10^6$	$6,3 \times 10^4$
E2	$6,6 \times 10^5$	$5,5 \times 10^6$	$1,0 \times 10^2$	$1,9 \times 10^6$
E3	$3,0 \times 10^5$	$1,5 \times 10^7$	$< 10^2$	$1,3 \times 10^6$
F1	$1,6 \times 10^4$	$1,8 \times 10^5$	$6,4 \times 10^5$	$2,2 \times 10^3$
F2	$< 10^2$	$1,6 \times 10^7$	$< 10^2$	$6,2 \times 10^4$
F3	$< 10^2$	$3,6 \times 10^6$	$1,0 \times 10^2$	$1,3 \times 10^4$
G1	$4,6 \times 10^5$	$1,9 \times 10^5$	$< 10^2$	$< 10^2$
G2	$< 10^2$	$3,0 \times 10^5$	$6,7 \times 10^4$	4×10^4
G3	$2,5 \times 10^5$	$3,6 \times 10^6$	$< 10^2$	$< 10^2$
H1	$5,1 \times 10^6$	$8,1 \times 10^6$	$6,0 \times 10^2$	$7,8 \times 10^5$
H2	$2,0 \times 10^4$	$1,5 \times 10^6$	$< 10^2$	$< 10^2$
H3	$1,0 \times 10^4$	$7,3 \times 10^6$	$< 10^2$	$1,4 \times 10^6$
I1	$6,0 \times 10^4$	$8,0 \times 10^6$	$4,0 \times 10^5$	$8,4 \times 10^4$
I2	$2,6 \times 10^4$	$1,4 \times 10^6$	$4,9 \times 10^4$	$< 10^2$
I3	$< 10^2$	$4,3 \times 10^5$	$1,5 \times 10^4$	$2,6 \times 10^6$
J1	$4,0 \times 10^4$	$3,5 \times 10^6$	$4,3 \times 10^5$	$2,6 \times 10^4$
J2	$2,0 \times 10^2$	$1,3 \times 10^7$	$< 10^2$	$8,8 \times 10^4$
J3	$< 10^2$	$1,5 \times 10^6$	$< 10^2$	$< 10^2$
K1	$5,1 \times 10^6$	$2,4 \times 10^7$	$< 10^2$	$< 10^2$
K2	$< 10^2$	$1,8 \times 10^6$	$< 10^2$	$8,1 \times 10^5$
K3	$1,7 \times 10^5$	$9,0 \times 10^7$	$< 10^2$	$< 10^2$
L1	$1,0 \times 10^2$	$1,0 \times 10^7$	$< 10^2$	$< 10^2$
L2	$< 10^2$	$2,3 \times 10^3$	$< 10^2$	$< 10^2$
L3	$< 10^2$	$7,5 \times 10^6$	$< 10^2$	$4,7 \times 10^3$
M1	$5,3 \times 10^3$	$2,8 \times 10^4$	$8,4 \times 10^5$	$1,9 \times 10^5$
M2	$< 10^2$	$7,0 \times 10^7$	$1,2 \times 10^3$	$3,0 \times 10^5$
M3	$< 10^2$	$3,0 \times 10^4$	$< 10^2$	$6,6 \times 10^3$
N1	$< 10^2$	$2,8 \times 10^3$	$1,0 \times 10^2$	$< 10^2$
N2	$< 10^2$	$4,0 \times 10^4$	$< 10^2$	$< 10^2$
N3	$< 10^2$	$3,1 \times 10^6$	$2,7 \times 10^3$	$1,6 \times 10^5$
O1	$< 10^2$	$3,6 \times 10^4$	$< 10^2$	$< 10^2$
O2	$< 10^2$	$3,7 \times 10^4$	$1,4 \times 10^4$	$< 10^2$
O3	$< 10^2$	$6,7 \times 10^3$	$1,0 \times 10^2$	$< 10^2$

^a : entre parênteses, resultado da determinação de *B. cereus* psicrófilo.

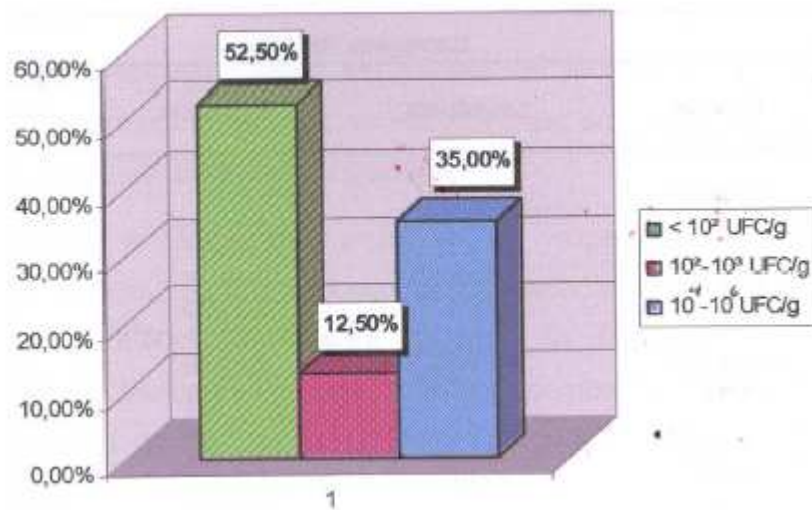


Figura 3 – Distribuição da contagem de bolores em 40 amostras de ricotas

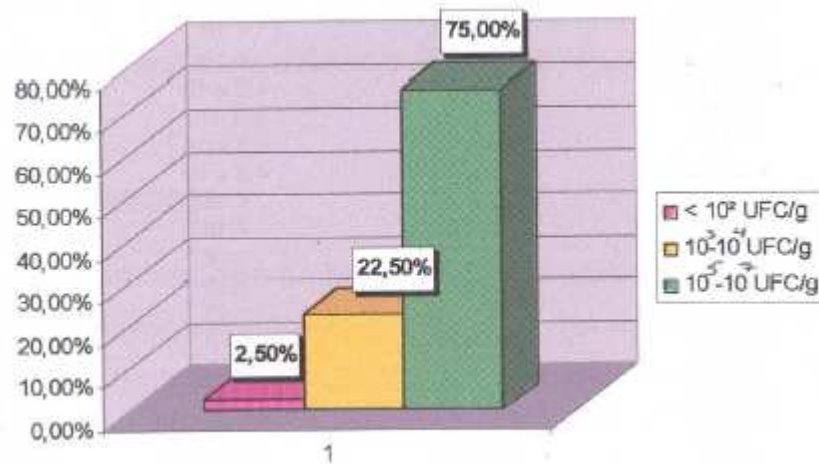


Figura 4 – Distribuição da contagem de leveduras em 40 amostras de ricotas.

No caso específico da ricota, altas contagens destes microrganismos são críticas para a estabilidade e vida de prateleira, e indicam falta de higiene na fabricação.

Raimundo (2004) constatou que 100% (6/6) das amostras de ricotas analisadas continham fungos filamentosos e leveduras, tanto na data de fabricação como no término da vida útil do produto, com contagens variando de $9,0 \times 10^2$ UFC/ g a $5,4 \times 10^8$ UFC/g.

4.2.2.2 *Bacillus cereus*

A contagem de *B. cereus* em amostras de ricotas pode ser observado na **Tabela 12**. Do total de amostras analisadas, 51,1% (23/45) delas apresentaram-se positivas para o microrganismo, correspondendo a 13 diferentes marcas.

Foram isoladas 134 colônias típicas de *Bacillus cereus* englobando tanto as mesófilas quanto as psicrotróficas. Após os testes, conforme descrito por Bennet e Belay (2001), para a confirmação de inclusão no grupo de *B. cereus*, 79,1% (106/134) das colônias foram confirmadas como sendo de *B. cereus*; totalizando 51,1% (23/45) de amostras positivas para *B. cereus* mesófilo, representando 13 marcas diferentes e 1 amostra (2,2%) positiva para *B.cereus* psicrotrófico.

Conforme pode ser visualizado na **Figura 5** as contagens variaram de 10^2 a 10^6 UFC/g, sendo que 28,9% (13/45) encontraram-se entre 10^4 à 10^6 UFC/g, fato este preocupante, pois os alimentos associados aos surtos diarreicos por *B. cereus* normalmente são ricos em proteínas, como produtos lácteos, com contagens entre 10^5 e 10^7 células ou esporos /g ou ml .

Cosseddu (1997), analisou 32 amostras de ricotas na Itália, detectando *B. cereus* em 6,25% (2/32) das amostras.

A presença de *B. cereus* em ricotas pode ocorrer devido a diversos fatores, como elevada resistência térmica dos esporos ao calor, estocagem do alimento em temperatura inadequada, e contaminação do leite utilizado na fabricação e do ambiente onde o queijo é processado.

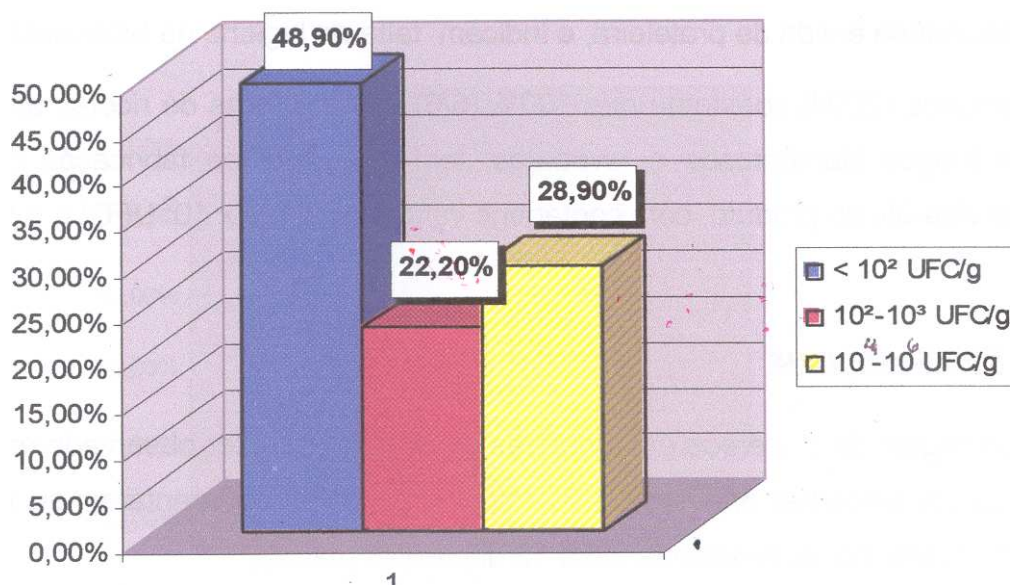


Figura 5: Faixas de contagens de *B. cereus* nas 45 amostras analisadas

Rocha (2004) encontrou *B. cereus* em superfícies de ambientes (plataforma de recepção, sala de tanques, câmaras frias), equipamentos (bombas de transporte de soro) e utensílios (liras de inox, formas de queijo, bandejas, caixas de expedição) em indústria processadora de queijo Minas frescal e enfatizou a importância da higienização da bomba de transporte de soro que serviria justamente à fabricação de ricota.

Lin et al. (1998) pesquisou *B. cereus* em leite pasteurizado e no ambiente do laticínio e, concluiu que embora o ambiente fosse uma fonte potencial de contaminação, a principal causa da presença de *B. cereus* no produto final era devido a contaminação inicial do leite cru.

Apesar da literatura apresentar poucas pesquisas envolvendo *B. cereus* com característica psicrotrófica, acreditamos que deveria existir uma preocupação maior por parte da indústria de alimentos, principalmente em relação aos pratos prontos para consumo e outros produtos que são estocados à temperatura de refrigeração.

Em nosso trabalho, apenas uma cepa de *B. cereus* foi capaz de crescer a temperatura de 7°C, atingindo uma contagem elevada ($1,3 \times 10^6$ UFC/g).

Dufrenne et al. (1994) pesquisando 31 cepas de *B. cereus* isolados de várias fontes como leite, arroz, produtos derivados de ovos e batatas, constataram que 17% eram capazes de crescer à temperatura $\leq 7^{\circ}\text{C}$ e produzir enterotoxinas.

Dufrenne et al. (1995) isolaram doze cepas de *B. cereus*, diferentes produtos como leite, envolvidos em surtos alimentares, e capazes de crescer a 7°C . O tempo de geração a 7°C , variou de 9,4 a 75,2 h em leite e caldo BHI (Brain Heart Infusion Broth), demonstrando o potencial desses microrganismos psicrófilos crescerem rapidamente à temperatura de refrigeração. Estas mesmas cepas foram 100% positivas para produção de enterotoxinas diarréica em caldo BHI.

Van Netten et al. (1990) pesquisaram cepas relacionadas a surtos devido a *B. cereus* na Espanha e Holanda e verificaram que as mesmas produziam enterotoxinas em 24 dias quando incubadas a 4°C , 12 dias a 7°C e 48 h a 17°C .

A completa eliminação de *B. cereus* de ambientes onde se processam produtos lácteos é muito difícil, pois esta bactéria, tanto na forma vegetativa quanto esporulada, encontra-se amplamente disseminada no ambiente. Além disso, os esporos são hidrofóbicos, com capacidade de adesão às superfícies que contatam o alimento; há a formação de biofilmes de difícil remoção e também pasteurização do leite (o qual é uma das fontes de contaminação da ricota) é insuficiente para destruição dos esporos que ali permanecem (PENG et al., 2002; LIN et al., 1998; PIIRTTIJÄRVI et al., 1998; ANDERSSON et al., 1995).

A estocagem a baixas temperaturas ($\leq 4^{\circ}\text{C}$), a higienização criteriosa dos equipamentos, utensílios e ambiente e o controle da matéria-prima (leite) são essenciais para impedir que estes microrganismos alcancem níveis suficientes (dose infectiva) para causar doenças. Portanto a qualidade microbiológica deste produto, está diretamente relacionada às Boas Práticas de Fabricação, desde a obtenção da matéria prima, passando pelas diversas etapas de processamento e distribuição.

Na legislação brasileira (RDC 12/2001), a definição de *B. cereus* como critério microbiológico é restrito à algumas classes de alimentos principalmente a base de cereais e derivados com limites variando de 5×10^2 a 5×10^3 UFC/g. Assim, em função

dos resultados e da discussão apresentados neste trabalho fica a sugestão para que *B. cereus* seja definido como critério microbiológico para leites pasteurizados e derivados.

4.2.2.3 Estafilococos coagulase negativa

Apesar da incidência de estafilococos coagulase positiva ter sido relativamente baixa, uma análise complementar revela um fato preocupante, que foi a constatação de um elevado índice de amostras (51,1%; 23/45) com a presença de estafilococos coagulase negativa (**Tabela 12**). A importância deste dado está relacionada à capacidade potencial destas cepas em produzir toxinas, as quais já foram correlacionadas a surtos de intoxicação alimentar (PEREIRA, PEREIRA, 2005).

Segundo Rozand et al. (1996), onze de 187 cepas de estafilococos coagulase negativa isoladas de queijos, soro e leite de cabra eram enterotoxigênicas. Chou e Chen (1997) observaram que *S. warnei* CCR 12929, uma cepa coagulase negativa, apresentou capacidade de produção das toxinas SEA e SED.

4.2.2.4 Relação entre prazo de validade, condições de estocagem e qualidade microbiológica

O panorama global da qualidade microbiológica das amostras de ricotas em nosso trabalho, mostrando o quadro preocupante em que os produtos são apresentados ao consumidor nos conduz a uma reflexão sobre as informações obrigatórias dos rótulos, em particular àquelas relativas aos prazos de validade e condições de estocagem dos produtos.

Neste trabalho, as análises microbiológicas foram realizadas após 9 a 15 dias da data de fabricação conforme descrição aposta nos rótulos dos produtos. Nestas condições, os resultados apresentados na **Tabela 10** revelaram porcentagem muito elevada de amostras (46,7%) em desacordo, com a Resolução RDC 12/2001 (BRASIL, 2001a) que trata dos padrões microbiológicos.

Esse quadro é preocupante tendo em vista que nos rótulos das amostras de ricotas avaliadas, os prazos de validade variavam de 17 a 60 dias e a temperatura de estocagem recomendada situava-se entre 8 a 10 °C (**Tabela 13**); também foi observado

a falta de uniformidade nos prazos de validade entre amostras de uma mesma marca (amostras B, C, E, G, I, K). Estes parâmetros são determinados pelas próprias indústrias produtoras e em alguns casos definidos por critérios próprios, como tempo necessário de transporte a outras localidades, que não refletem critérios técnicos de qualidade e segurança dos alimentos.

Os prazos de validade fixados pelos produtores em geral estão acima da durabilidade média relatada, assim como a temperatura de estocagem. Carminatti et al. (2002), utilizaram onze amostras provenientes de três indústrias diferentes e avaliaram a vida de prateleira das ricotas a 4 °C, 8°C e 12 °C, estas duas últimas consideradas como temperatura de abuso. As análises microbiológicas (coliformes, micrococos, enterococos, leveduras, bactérias psicrotróficas e *Listeria*), mostraram que a ricota é altamente perecível à temperatura acima de 4 °C e apenas ricota com alta qualidade microbiológica pôde suportar 7 dias a 4 °C; quanto as amostras estocadas a 8 e 12 °C, a vida de prateleira foi reduzida a 2 dias. Modler e Emmons (2001) preconizaram uma vida de prateleira para ricota de duas a quatro semanas, pela sua alta perecibilidade.

Tabela 13 Prazo de validade e temperatura de estocagem descritos nos rótulos das amostras de ricotas.

Amostra	IFA^a	Prazo de validade	Temperatura recomendada
A1	15	45	Até 10º C
A2	14	45	Até 10º C
A3	14	45	Até 10 ºC
B1	9	20	Até 8º C
B2	8	20	Até 8º C
B3	8	30	Até 8º C
C1	9	19	Até 8º C
C2	9	19	Até 8º C
C3	14	25	Até 8º C
D1	11	29	Até 10º C
D2	14	29	Até 10º C
D3	9	29	Até 10º C
E1	11	18	Até 8 ºC
E2	15	20	Até 8º C
E3	14	21	Até 8º C
F1	12	45	Até 8º C
F2	11	49	Até 8º C
F3	13	45	Até 8º C
G1	14	60	Até 8º C
G2	8	30	Até 8º C
G3	15	61	Até 8º C
H1	10	30	Até 8º C
H2	14	30	Até 8º C
H3	15	30	Até 8º C
I1	12	28	Até 10º C
I2	13	30	Até 10º C
I3	7	31	Até 10º C
J1	11	20	Até 8º C
J2	9	20	Até 8º C
J3	15	20	Até 8º C
K1	12	18	Até 8º C
K2	9	19	Até 8º C
K3	15	23	Até 8º C
L1	12	17	Até 8º C
L2	12	17	Até 8º C
L3	14	17	Até 8º C
M1	10	60	Até 10º C
M2	14	60	Até 10º C
M3	13	60	Até 10º C
N1	10	46	Até 8º C
N2	14	46	Até 8º C
N3	12	46	Até 8º C
O1	11	30	Até 8º C
O2	11	30	Até 8º C
O3	10	29	Até 8º C

^a Intervalo de tempo (dias) entre a fabricação e a análise das amostras.

4.3 AVALIAÇÃO DE FATORES DE RISCOS ASSOCIADOS ÀS AMOSTRAS DE RICOTAS COMERCIAIS

4.3.1 Enterotoxina estafilocócica pré-formada nas ricotas comerciais

Foram analisadas 45 amostras de ricotas comerciais, quanto à presença de enterotoxinas estafilocócicas pré-formadas e em 100% (45/45) os resultados dos testes foram negativos. As contagens de estafilococos variaram de 10^2 a 10^6 UFC/g (**Tabela 10** e **Tabela 12**), sendo assim com o decorrer da vida de prateleira dos produtos, uma população na ordem de 10^6 ou mais UFC de estafilococos enterotoxigênico por grama de alimento poderia ser atingida e, portanto chegar a produzir toxinas em níveis detectáveis e suficiente para causar intoxicação (BENNETT; LANCETTE, 2001).

A temperatura de refrigeração é um fator limitante para a produção destas toxinas, com maior produção a 37°C (OLIVEIRA, 1999). Este fato reforça a importância da conservação a temperaturas abaixo de 4°C e o perigo da utilização deste produto na preparação de pratos que podem permanecer expostos durante longos períodos à temperatura ambiente, tais como patês.

4.3.2 Produção de enterotoxinas por isolados de estafilococos coagulase positiva e negativa

Em uma primeira etapa, foram selecionados 147 isolados presuntivos de estafilococos, de 34 amostras que foram submetidas ao teste de crescimento em ágar Furazolidona para diferenciação entre cepas de estafilococos e de micrococos, já que as demais provas, como coloração de gram, teste de catalase e coagulase, não eram conclusivas na diferenciação das mesmas.

Do total de isolados, 62,6% (92/147), representando 30 amostras, foram classificados como micrococos e 37,4% (55/147), como estafilococos, representando 21 amostras. Estes resultados demonstram a importância da diferenciação entre estes dois gêneros muito similares, e que poderia resultar em uma falsa identificação e contagem.

Num segundo momento, os 55 isolados de estafilococos coagulase positiva e negativa foram testados quanto à produção de enterotoxinas, e destes, 23,64% (13/55), representando 11 amostras foram positivos ao kit ViDAS SET "Staph enterotoxin" (Biomérieux). Dentre os 13 isolados positivos, quatro eram coagulase positiva e 9 coagulase negativa (**Tabela 14**).

Até o momento, na epidemiologia dos surtos de intoxicação estafilocócica, pouca importância tem sido dada às espécies coagulase negativa, embora haja dados na literatura relatando tanto cepas produtoras de enterotoxinas, quanto surtos de intoxicação alimentar, causadas por estafilococos coagulase negativa, que reforça o perigo que estes microrganismos representam para a população (PEREIRA, PEREIRA, 2005).

Outra observação importante que se pode ressaltar é que quatro isolados coagulase positiva e seis isolados coagulase negativa apresentaram resultados negativos ao teste de lecitinase, cuja reação é característica dos estafilococos; além disso, as colônias não apresentaram dimensões características (2-3 mm). Este dado é preocupante, pois a não observação do halo de lecitinase e do tamanho característico da colônia, pode conduzir à leitura como pertencente a uma colônia atípica, sendo então desconsiderada na contagem ou na sequência das provas bioquímicas e/ou de produção de enterotoxinas. Isto demonstra que a análise de rotina, na determinação de estafilococos coagulase positiva é deficiente, podendo ser descartados microrganismos potencialmente produtores de enterotoxinas

Oliveira (1995) constatou que alguns isolados do gênero *Staphylococcus* apresentaram reação negativa ao teste de catalase e foram produtores de enterotoxinas. As bactérias do gênero *Staphylococcus* são catalase positiva.

Tabela 14. Características dos estafilococos produtores de enterotoxinas isolados de amostras de ricotas.

Isolados	Amostra	Contagem (UFC/g)	Teste de Catalase	Teste de Coagulase	kit ViDAS SET”(vt) ^a
1	A3	2,8 X 10 ²	positiva	positiva	positivo (1.55)
2	A3	2,8 X 10 ²	positiva	positiva	positivo (1.55)
3	A3	2,8 X 10 ²	positiva	positiva	positivo (1.95)
4	E2	4,7 x 10 ⁵	positiva	negativa	positivo (1.56)
5	F3	1,24 x 10 ³	positiva	negativa	positivo (2.00)
6	H3	2,33 x 10 ⁵	positiva	negativa	positivo (2.01)
7	I1	8,4 x 10 ³	positiva	negativa	positivo(2.03)
8	I3	1,07 x 10 ⁶	positiva	negativa	positivo(2.07)
9	J1	2,9 x 10 ⁴	positiva	negativa	positivo (2.00)
10	J2	8,8 x 10 ³	positiva	negativa	positivo (1.54)
11	K2	8,1 x 10 ⁴	positiva	negativa	positivo (1.99)
12	K3	1,35 x 10 ³	positiva	negativa	positivo (2.00)
13	N2	4,7 x 10 ³	positiva	positiva	positivo (2.01)

^a : valores do teste (vt) > 0.13, considerado positivo para a presença de enterotoxina (VIDAS Staph Enterotoxin ; Biomerieux®)

Segundo Bennet (1996), sete colônias de estafilococos, atípicas em ágar BP, foram produtoras de enterotoxinas dos tipos A, B e C, e algumas destas, também foram coagulase, lisozima e Tnase negativa, o que demonstra que o comportamento metabólico destes microrganismos pode variar, mas mesmo assim, continuam com a capacidade de produção de enterotoxinas.

A técnica de isolamento em Baird Parker (BP) nem sempre detecta células injuriadas pelo tratamento térmico, freqüentemente utilizado no processamento dos alimentos (BERGDOLL, 1990 apud SÁNCHEZ et al, 2003).

A detecção de enterotoxinas pré-formadas nos alimentos e a capacidade dos isolados produzirem estas toxinas seria o ideal para prevenir e controlar as intoxicações alimentares causadas por estas toxinas. Os métodos de detecção de enterotoxinas estão em constante desenvolvimento, sendo os mais freqüentemente utilizados os de imunodifusão, imunoaglutinação, radioimunoensaio e a técnica de ensaio enzimático (EIA). Entre os vários métodos utilizados, o método ELISA tem sido largamente empregado, em kits rápidos, mas são importados e de valor considerado inacessível para os laboratórios de controle de alimentos, assim como as técnicas baseadas na manipulação do material genético (DNA e RNA) que também tem sido uma alternativa desenvolvida e aprimorada para os estafilococos (SÁNCHEZ et al., 2003; TAMAPURU et al., 2001). Entretanto, em geral, o diagnóstico de intoxicação estafilocócica continua sendo realizado através da contagem de colônias e identificação bioquímica das cepas isoladas dos alimentos suspeitos.

4.3.3 Enterotoxinas e perfil toxigênico de *Bacillus cereus* isolados de amostras comerciais de ricotas

Foram isoladas 134 colônias presuntivas de *B. cereus* a partir de amostras de ricotas comerciais, sendo estas submetidas a testes de confirmação e identificação, onde, 106 colônias foram identificadas como pertencentes a *B. cereus*.

Na avaliação de *Bacillus cereus* mesófilo, 53,3% das amostras (24/45), provenientes de 13 marcas diferentes, apresentaram este microrganismo enquanto que, o *Bacillus cereus* psicrotrófico, apresentou-se em 2,2% das amostras (1/45).

Destes isolados, 42 (39 mesófilos e 3 psicrotróficos) foram analisados quanto ao potencial enterotoxigênico através do kit Tecra BDE-VIA e da pesquisa de genes codificadores de enterotoxinas pela PCR (**Tabela 15**).

Os três genes que codificam a hemolisina BL (*hblA*, *hblD* e *hblC*) foram detectados em 26,2% (11/42) dos isolados; 45,22% (19/42) apresentaram um ou dois genes e nenhum dos três genes foram detectados em 28,58% (12/42) dos isolados.

Vários estudos publicados ao longo dos anos têm demonstrado que a maior parte das cepas de *B. cereus* são capazes de produzir NHE; embora, apenas cerca de 50% de HBL são detectados (HANSEN, HENDRIKSEN, 2001; VELD et al., 2001).

Borge et al. (2001) constataram que duas cepas isoladas de surtos alimentares eram HBL negativo.

Os três genes que codificam o complexo NHE (*nheA*, *nheB*, *nheC*) foram detectados em 80,9% (34/42) dos isolados e 19,1% (8/42) apresentaram um ou dois desses genes que codificam o complexo.

As três proteínas do complexo NHE são necessárias para a máxima atividade citotóxica, embora a combinação de duas delas em elevados níveis, já seja suficiente para promover a atividade citotóxica (GRANUM; LUND, 1997).

Tabela 15 . Perfil toxigênico de cepas de *B. cereus* isoladas de ricotas

Perfil (marcas)	Nº de isolados	Complexo genético						Teste ELISA ^b positivo Nº
		HBL ^a			NHE ^a			
		<i>hblA</i>	<i>hblD</i>	<i>hblC</i>	<i>nheA</i>	<i>nheB</i>	<i>nheC</i>	
Perfil I (I,M,C,G,O,D)	10	-	+	-	+	+	+	6
Perfil II (F,C,A,O,I)	11	+	+	+	+	+	+	10
Perfil III (H,B,G,N)	8	-	-	-	+	+	+	8
Perfil IV (N,C)	3	-	-	-	-	+	+	3
Perfil V (B)	1	+	-	-	+	+	+	1
Perfil VI (CE)	2	-	+	+	+	+	+	1
Perfil VII (J)	1	-	-	-	+	-	+	1
Perfil VIII (G)	1	-	+	-	-	+	+	1
Perfil IX (J,M)	2	-	+	+	-	+	+	2
Perfil X (M, N)	2	+	+	-	+	+	+	2
Perfil XI (N)	1	+	+	-	-	+	+	1

^a + : foi observado produto com peso esperado; -: não foi observado produto do PCR com peso esperado.

^b KIT Tecra BDE-VIA. Resultados obtidos conforme instruções do fabricante.

A pesquisa para caracterização molecular de 42 cepas de *B. cereus*, através da técnica PCR, dos complexos NHE e HBL resultou na identificação de 11 perfis toxigênicos distintos. Dentre eles os isolados psicrotróficos apresentaram os perfis I e VI. A heterogeneidade das cepas de *B. cereus* quanto à presença de fatores de virulência atesta o dinamismo da sua ecologia e o alto potencial enterotoxigênico dos isolados

Os ensaios com o kit Tecra BDE-VIA, que detecta a proteína codificada pelo gene *nheA* (45 KDa) do complexo NHE (Lund; Granum, 1996), revelaram que 85,7% (36/42) dos isolados de *B. cereus* produzem esta toxina. Nenhuma das cepas psicrotróficas apresentou resultado positivo neste teste, apesar do gene *nheA* ter sido detectado nestes isolados pela PCR. O mesmo ocorreu com 3 outros isolados mesófilos. O kit BDE detecta a presença de enterotoxinas em concentrações de até 1ng por ml, segundo o fabricante, e pode não ter sido sensível o suficiente para detectar a quantidade de proteína (*nheA*) nas cepas psicrotróficas.

Em contrapartida, o gene *nheA* não foi detectado em 7 dos 36 isolados positivos para o teste Tecra BDE-VIA (**Tabela 15**). Este teste, detecta, além da proteína 45 kDa, o componente protéico 105 kDa do complexo NHE, embora com sensibilidade dez vezes menor (LUND; GRANUM, 1996). O gene *nheC*, que codifica esse componente, foi detectado nesses isolados que se apresentaram positivos.

Resultados semelhantes foram encontrados por Soares (2004), que dos 61,4% dos isolados de *B. cereus* produtores de enterotoxinas segundo teste positivo pelo kit Tecra BDE-VIA, em oito deles não foi isolado o gene *nheA*.

Guinebretière et al. (2002) avaliaram o perfil toxigênico de 51 cepas de *B. cereus* (isoladas de casos de toxinfecções alimentares), das quais onze isolados também foram negativos para o teste, apesar do gene *nheA* ter sido detectado.

Dufrenne et al. (1994) pesquisando 31 cepas de *B. cereus* obtidas de várias fontes como leite, arroz, produtos derivados de ovos e batatas, constataram que 17% eram capazes de crescer à temperatura $\leq 7^{\circ}$ C e estas foram produtoras de enterotoxinas pelo teste Tecra BDE-VIA.

Tabela 16. Comparação entre os resultados obtidos através da técnica PCR para o gene *nheA* e o imunoensaio Tecra BDE-VIA para *B. cereus*

Relação	Nº de isolados	%
<i>nheA</i> + / Tecra -	6	14,3%
<i>nheA</i> - / Tecra +	7	16,7%
<i>nheA</i> +/ Tecra +	29	69,0%
Total	42	100%

Um fato preocupante é que 78,6%% (33/42) dos isolados aqui analisados eram provenientes de amostras de ricotas cuja contaminação por *B. cereus* encontravam-se na faixa de 10^4 a 10^6 UFC/g, condição esta muito próxima ã surtos diarréicos por *B. cereus* já relatados envolvendo alimentos ricos em proteínas, como produtos lácteos e que apresentavam com contagens entre 10^5 e 10^7 células ou esporos /g ou ml.

Conforme já discutido anteriormente uma das alternativas para o controle efetivo da contaminação por *B. cereus* seria a adoção das BPF e particularmente o emprego de temperaturas de estocagem $\leq 4^\circ \text{C}$, o que evitaria também a germinação dos esporos e produção de enterotoxinas (RUSUL;YAACOB,1995, Van NETTEN et al. 1990).

4.3.4 Patogenicidade das cepas isoladas de *Listeria monocytogenes*

Das 135 cepas de *Listeria spp*, isoladas de 9 amostras de ricota, 30 foram analisadas pelo KIT API Listeria (Biomérieux ®), e 105 pelas provas bioquímicas recomendadas pelo Health Products Food Brand, do Canadá (PAGOTTO et al., 2001).

Treze isolados foram positivos para *Listeria monocytogenes* pelo kit API Listeria®. Estes, foram subtipados utilizando a análise alélica dos genes de virulência *actA* e *hly* por PCR-RFLP (Polimorfismo do comprimento do fragmento de restrição).

O gene *actA* tipo 4 foi encontrado em todos os isolados, não sendo encontrado o tipo 3. O gene *hly* encontrado foi sempre do tipo 1. A análises dos tipos de *actA* e *hly* nos permite separar a *L. monocytogenes* em três linhagens. Os isolados de *Listeria monocytogenes* apresentaram-se como pertencentes à linhagem I (**Tabela 17**).

Os estudos de polimorfismo alélico dos genes de virulência (WIEDMANN et al.,1997; MORIISH et al.,1998) revelaram que o gene *actA* apresenta 2 alelos denominados tipos 3 e 4.

Segundo Wiedman et al. (1997) a linhagem I contém cepas dos sorotipos 1/2b, 3b, 3c e 4b, associados a ocorrência de surtos e casos de listeriose em humanos, sugerindo um maior potencial patogênico ao homem quando comparado às outras linhagens.

Jeffers et al. (2001) ao avaliar 195 isolados (humanos, animal, ambiente e alimento), encontrou os alelos de *hly* tipo 1 e 2 sendo os mais comuns. O alelo *hly* tipo 1 representou 64,7% dos isolados humanos. Entre os tipos alélicos de *actA*, não houve diferenças na distribuição entre os isolados.

Kabuki (2004) ao analisar 36 isolados de *L. monocytogenes* de amostras de plantas de processamento de queijo fresco tipo latino, encontrou que 24 pertenciam à linhagem I (*actA* tipo 4 e *hly* tipo 1).

Tabela 17. Subtipagem dos treze isolados de *Listeria monocytogenes*

Isolados	<i>actA</i>	<i>hly</i>	Linhagem
(Amostra)	tipo	tipo	
1 (01)	4	1	I
2 (01)	4	1	I
3 (01)	4	1	I
4 (01)	4	1	I
5 (01)	4	1	I
6(01)	4	1	I
7 (H3)	4	1	I
8 (H3)	4	1	I
9 (03)	4	1	I
10 (03)	4	1	I
11 (03)	4	1	I
12 (03)	4	1	I
13 (03)	4	1	I

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE INDÚSTRIA DE QUEIJOS(ABIQ) **Produção de queijos no Brasil**. Mensagem recebida por luesper@fea.unicamp.br em 19 nov.2004.

ALMEIDA FILHO, E.S.;NADER FILHO,A. Ocorrência de coliformes fecais e *Escherichia coli* em queijo tipo Minas Frescal de produção artesanal comercializado em Poços de Caldas, MG. **Revista Higiene Alimentar**, v.16, n102/103,p.71-73,2002.

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

ALMEIDA, P. M. P.; FRANCO, R. M. Avaliação bacteriológica de queijo tipo frescal com pesquisa de patógenos importantes à saúde pública: *Staphylococcus aureus*, *Salmonella sp* e coliformes fecais. **Revista Higiene Alimentar**, São Paulo, v.17, n.111, p.79-85, agosto,2003.

ANDERSSON, A.; RONNER, U.; GRANUM, P. E. What problems 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.

ANDREWS,H. W.;FLOWERS,R.S, SILIKERS,J.,BAILEY,S.J. *Salmonella*. In:..APHA (American Public Health Association).**Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods**, 4^o ed. Washington: APHA,.Chap.37 ,p.357-380. 2001

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS(AOAC). **Official methods of analysis of AOAC international**. 16 ed. Washington, 1995.

AURELI, P.; CONSTANTINI, A.; FENICIA, L.; GIANFRANCESCHI, M.; RAINALDI, L. Occurrence of pathogenic Escherichia coli in available Italian soft cheese. **Archiv fur lebensmittelhygiene**, v.43, p.17-19, 1992. Disponível em :<www.wos02.isiknowledged.com/CIW.cgi>. Acesso em :26 nov.2004.

BAIRD –PARKER,A.C. The staphylococci: an introduction. **Journal of Applied Bacteriology**- Symposium Supplement,v.69,p.1S-8S,1990.

BARROS,P.C.O.G.;NOGUEIRA,L.C.;RODRIGUEZ,E.M.;CHIAPPINI. Avaliação da qualidade microbiológica do queijo Minas Frescal comercializado no município do Rio de Janeiro, R.J.**Revista Higiene Alimentar**, vol18, n122, p57-61,2004.

BELTRÁN, J.F.N.; NETO, A.C.; PIRES, E.M.F.; STAMFORD, T.L.M. Avaliação microbiológica de refeições servidas por empresas aéreas nacionais. **Revista Higiene Alimentar**, São Paulo .v.13, n.59, p.49-56, jan/fev 1999.

BENNET,R.W. Atypical Toxigenic Staphylococcus and Non-Staphylococcus aureus Species on the Horizon ? An Update. **Journal of Food Protection**.vol.59,n.10,p.1123-1126,1996.

BENNETT,R. W.; BELAY,N Bacillus cereus. In:..APHA (American Public Health Association).**Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods**, 4 º ed. Washington: APHA,.Chap.32,p.311-316, 2001.

BENNETT, R. W.; LANCETTE, G. A. ***Staphylococcus aureus*** In:UNITED STATES. Food and Drugs Administration Bacteriological Analytical Manual., 8º ed (revisão A)., 2001. Cap 12. Disponível em: <http://www.cfsan.fda.gov/~ebam/bam-12.html>. Acesso em: 17 nov. 2004.

BERESFORD, T.P.; FITZSIMONS, N. A.; BRENNAN, N. L.; COGAN, T. M. Recent advances in cheese microbiology. **International Dairy Journal.** n11, p.259-274, 2001.

BEUCHAT,L.R.;COUSIN,M.A. Molds and Yeast. In:APHA (American Public Health Association).**Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods**, 4 º ed. Washington: APHA, 2001.Chap.20,p.209-213

BOGGS,J.D.; WHITWAM,R.E.; HALE,L.M.; BRISCOE,R.P.; KAHN,S.E.; MACCORMACK,J.N.; MAILLARD,J-M.; GRYSON,S.C.; SIGMON,K.S.; REARDON, J.W.; SAAH, J.R. Outbreak of listeriosis associated with homemade Mexican-style cheese – North Caroline, October 2000- January 2001. **Morbidity and Mortality Weekley Report**, Atlanta, v.50,n.26, p.560-562, July, 2001.

BORGE,G.A.; SKEIKE,M.; SORHAUG,T.; LANGSRUD,T.; GRANUM,P.E. Growth and toxin profiles of *Bacillus cereus* isolated from different sources. **International Journal of Food Microbiology.** v.69,p.237-246,2001.

BRASIL. Portaria nº 146, de 07 de março de 1996. Aprova regulamentos técnicos de identidade e qualidade dos produtos lácteos. **Ministério da Agricultura, do Abastecimento e da Reforma Agrária.** Brasília, 50p.1996.

BRASIL. Ministério da Agricultura e Pecuária. Regulamento de Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal: MAPA, 1997.

BRASIL. Resolução RDC nº 12, de 02 de janeiro de 2001. Aprova regulamento técnico sobre os padrões microbiológicos para alimentos. **Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária.** Brasília, 18p,2001a.

BRASIL, Resolução nº 40, de 21 de março de 2001. Aprova o regulamento técnico para rotulagem nutricional obrigatória de alimentos e bebidas embalados. Diário Oficial da União, Brasília,n.57-E,22 mar..Seção1,p.22. 2001b

BRASIL, Resolução nº 360, de 23 de dezembro de 2003. Aprova o regulamento técnico sobre rotulagem nutricional de alimentos embalados. Diário Oficial da União, Brasília, n.251, .Seção1, p.33,26 dez.2003a.

BRASIL. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária(EMBRAPA). **Produção mundial de queijos– 2003b.** Disponível em: <http://www.cnpqgl.embrapa.br/producao/04industria/tabela04.23.php>.> Acesso em: 14 nov. 2004.

BRECKING,J.C.; BERGDOLL,M.S. Outbreak of Food-borne Gastroenteritis Due to a Coagulase-Negative Enterotoxin-Producing Staphylococcus. **The New England Journal of Medicine**, v.284,n.10,p.541-543,1971.

CARMINATTI, D.;BELLINI,E.;PERRONE,A.; NEVIANI,E.;MUCCHETTI,G. Qualità microbiologica e conservabilità della ricotta vaccina tradizionale. **Industrie Alimentari**. XLI, p.549-555, 2002.

CARMO, S. L.; DIAS, R. S.; LINARDI, R. V.; SENA, M.J.; SANTOS, A.D.; FARIA, M. E. ;PENA, E. C.; JETT, M. HENEINE, G. Food poisoning due to enterotoxigenic strains of Staphylococcus present in Minas Cheese and raw milk in Brasil. **Food microbiology**. n.19, p.9-14, 2002.

CARVALHO, J. D. G. **Avaliação da qualidade de queijos tipo minas frescal elaborados por diferentes processos tecnológicos e comercializados em Campinas.** 2003. 107p. Dissertação (Mestre em Tecnologia de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade estadual de Campinas, Campinas, 2004.

CENTER FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (CDC). *Escherichia coli* Serotype O157:H7: Novel Vehicles of Infection and Emergence of Phenotypic Variants. **Emerging Infectious Diseases** vol.1, n.2.,1995. Disponível em: <http://www.cfsan.fda.gov/~mow/feng.html>. Acessado em : 10 dez.,2005.

CHECCHI,H.M. **Fundamentos teóricos e práticos em alimentos análise de alimentos.**2 ºed. Editora da UNICAMP,Campinas S.P,2003.

CHIAPPINI, C. C. J.; SANTOS, N.N. Determinação de alguns parâmetros físicos e químicos do soro do queijo. **Rev. Inst. Latic .Cândido Tostes**, Juiz de Fora, v.50, n.292, p.3-7, 1995.

CHIAPPINI, C. C.J.; FRANCO, R. M.; OLIVEIRA, L. A.T. Avaliação do soro de queijo quanto às bactérias heterotróficas aeróbias mesófilas e psicrotróficas viáveis. **Revista Inst. Latic. Cândido Tostes**. v50, n292, p.22-27, mar/abr,1995a.

CHIAPPINI, C. C.J.; FRANCO, R. M.; OLIVEIRA, L. A.T. Avaliação do soro de queijo quanto aos coliformes totais e coliformes fecais. **Revista Inst. Latic. Cândido Tostes**. v50, n292, p.11-15, mar/abr,1995b.

CHIAPPINI, C. C.J.; FRANCO, R. M.; OLIVEIRA, L. A.T. Avaliação do soro de queijo quanto à *Staphylococcus aureus* . **Revista Inst. Latic. Cândido Tostes**. v50, n292, p.17-21, mar/abr,1995c.

CHOU,C.C.; CHEN,L.F. Enterotoxin Production by *Staphylococcus warneri* CCRC 12929, a coagulase –Negative strain. **Journal of food protection**, vol 60,nº 8, p.923-927, 1997.

COSSEDU, A.M.; SANTIS, E.P.L.; MAZZETTE, R.; FRESI, A., LAI, G. Ricotta bovina fresca confezionata: caratteristiche microbiologiche di interesse igienico-sanitario. **Latte**. v.7, p.76-81, 1997.

CENTRO DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (C.V.S), Secretaria de Saúde de São Paulo. **Informe NET.Programa Paulista 2002** Disponível em: http://www.cvs.saude.sp.gov.br/pp02_relfinal.asp. Acessado em: 12dez de 2004.

De BUYSER M. L.; DUFOUR, B.; MARIE, M.; LAFARGE, V. Implication of milk and milk products in food-borne disease in France and in difference industrialised countries. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v.67, p.1-17, jan.2001.

DUFRENNE, J.; SOENTORO, P.;TATINI, S.; DAY, T.;NOTERMANS, S. Characteristics of *Bacillus cereus* related to safe food production. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v.23, p.99-109, 1994.

DUFRENNE, J.; BIJWAARD, M.;GIFFEL, M;BEUMER, R.; NOTERMANS, S. Characteristics of some psychrotrophic *Bacillus cereus* isolates. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v.27, p.175-183, 1995

ELEFThERiADOU, M.; TELLO, A. V.;LOIZIDOU, M. M.; NIKOLAOU, A. S.;AKKELIDOU, D. The microbiological profile of food in the republic of Cyprus: 1991-2000. **Food microbiology**. v.19, p.463-471, 2002.

EHLING-SHULZ,M.;FRICKER,M.SCHERER,S. Identification of emetic toxin producing *Bacillus cereus* strain by a novel molecular assay. **FEMS Microbiological Letters**,v.232,p.189-195,2004.

EVENSON,M.L.;HINDS,M.W.;BERNSTEIN,R.S.;BERGDOLL,M.S. Estimation of human dose of staphylococcal enterotoxin A from large outbreak of staphylococcal food poisoning involving chocolate milk. **International Journal of Food Microbiology**,v.7,n.4,p.311-316,1988.

FOOD AND DRUG ASSOCIATION (FDA). Enforcement report, Disponível em: www.fda.gov/bbs/topics/enforce/2003/ENF00797.html. Acesso em : 09 set. 2004.

FOX, P. F.; GUINEE, T.P.; COGAN, T.M.; McSWEENEY, P.L.H. **Fundamentals of cheese science**. Massachusetts: Kluwer Academic , 2000. 578p.

FRANCO, B. D. G. M.; LANDGRAF, M. **Microbiologia de Alimentos**. São Paulo, Editora Atheneu, 2002. 182p..

GAULIN,C.;RAMSAY,D.;RINGUETTE,L.;ISMAIL,J.; First document outbreak of *Listeria monocytogenes* in Quebec,2002. **Canada Communicable Disease Report**,v.29, n.21, Nov., 2003. Disponível em: hc-sc.gc.ca/pphb-dgspsp/publicat/ccdr-rmtc/03vol29/dr2921ea.html. Acesso em: 02/12/2005.

GIFFEL,M.C.;BEUMER,R.R.;GRANUM,P.E.;ROMBOUTS,F.M. Isolation and characterization of *Bacillus cereus* from pasteurized milk in household refrigerators in the Netherlands. **International Journal of Food Microbiology**, 34.p.307-318,1997.

GONZALEZ, A. G. M.; ROSA, A. C. P.; ANDRADE, J. R. C.; TIBANA, A. Enteropathogenicity markers in *Escherichia coli* strains isolates from soft white cheese and poultry in Rio de Janeiro, Brazil. **Food Microbiology**. v.17, p.321-328, 2000.

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

GRANUM ,P.E.; LUND,T. *Bacillus cereus* and its poisoning toxins. **FEMS Microbiology Letters**. v.157, p.223-228,1997.

GRANUM,P.E.; O' SULLIVAN,K.; LUND,T. The sequence of the non hemolytic enterotoxin operon from *Bacillus cereus*. **FEMS Microbiology Letters**.v.177,n.2,p.225-229,aug.1999.

GUELARDI,E. CELANDRONI, F., SALVETTI,S., BARSOTTI,C., BAGGIANI,A., SENESI,S. Identification and characterization of toxigenic *Bacillus cereus* isolates responsible for two food-poisoning outbreaks. **FEMS Microbiology Letters**,v.208,p.129-134, 2002.

GUERRA,M.M.; BERNARDO,F.A. Fontes de contaminação dos alimentos por *Listeria monocytogenes*.**Revista Higiene Alimentar**, v.18,p.12-17,2004.

GUINEBRETIÈRE,M.H.; BROUSOLE,V.; THE,C.N. Enterotoxigenic Profiles of Food-Poisoning and Food-Borne *Bacillus cereus* Strain. **Journal of Clinical Microbiology**. Vol 40,n.8,Aug.p.3053-3056, 2002.

GUINEE,T.P.; PUDJA,P.D.; FARKYE,N.Y. (1999) Fresh Acid-Curd Cheese Varieties. In: **Cheese: Chemistry, physics and microbiology** (2ed, vol1).1999.

HANSEN,B.M.;LESER,T.D.;HENDRIKSEN,N.B. Polymerase chain reaction for the detection of *Bacillus cereus* group cells. **FEMS microbiology Letters**,202,p.209-213,2001.

HANSEN,B.M.; HENDRIKSEN,N.B. Detection of enterotoxin *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis* strains by PCR analysis. **Applied and Environmental Microbiology**,v.67,n.1,p.185-189,jan.2001.

HOUGH, G.; PUGLIESO, M. L.; SANCHEZ, R.; DA SILVA, M. O. Sensory and Microbiological Shelf-Life of a Commercial Ricotta Cheese. **Journal of Dairy Science**, New York, v.82, n.3, p.454-459, 1999.

INTERNATIONAL COMMISSION ON MICROBIOLOGICAL SPECIFICATIONS FOR FOODS- ICMSF . **Microorganisms in food** : Characteristics of microbial pathogens. London: Blackie Academic & Professional, v.5.1998. 513p.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ (IAL). **Normas Analíticas do IAL** . D.B. Rebocho Ed. São Paulo-SP, 1985.

INTERNATIONAL DAIRY FEDERATION (IDF). **Determination of the total nitrogen content of milk by the Kjeldahl method**. Brussels, n.20, p.1-3, 1962.

INTERNATIONAL DAIRY FEDERATION (IDF). **Determination of the total solids content of cheese and processed cheese**. IDF-FIL., n.88, p.1-3, 1979.

INTERNATIONAL DAIRY FEDERATION (IDF). **Bacillus cereus in milk and milk products**. Chapter.6,n.287, p.30-37, 1993.

JEFFERS,G.T.; BRUCE,J.L.;McDONOUGH,P.L.; SCARLETT,J.;BOOR,K.J.; WIEDMANN,M. Comparative genetic characterization of *Listeria monocytogenes* isolates from human and animal listeriosis cases. **Microbiology**, v.147, p.1095-1104, May,2001.

KABUKI, D.Y. **Rastreamento de *Listeria monocytogenes* em indústrias processadoras de queijo Minas frescal tipo latino, nos Estados Unidos da América, empregando a subtipagem molecular**. Campinas, 2004. 143p. Tese (Doutorado em alimentos)- Faculdade de Engenharia de Alimentos), Universidade Estadual de Campinas.

KABUKI,D.Y,SOARES,C.M,SOUZA,R.M. KUAYE,A.Y. Avaliação da produção de enterotoxinas do complexo protéico NHE em *Bacillus cereus* isolados de produtos lácteos.In: Congresso Brasileiro de Microbiologia ,23.,2005,Santos.**Anais**.Santos: Sociedade Brasileira de Microbiologia. CD-ROM.

KERR,K.G.; BIRKENHEAD,D.; SEALE.K.; MAJOR,J.; HAWKEY,P.M. Prevalence of *Listeria* spp. On the hands of food workers. **Journal of Food Protection**,v.56,n.6, p.525-527,1993.

KORNACKI,J.L.;JOHNSON,J.L. Enterobacteriaceae, Coliforms, and *Escherichia coli* as Quality and Safety Indicators. In: .APHA (American Public Health Association).**Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods**, 4^o ed. Washington: APHA, 2001.Chap.8,p.69-82.

KOSIKOWSKI, F.V.; MISTRY, V.V. Soft Italian Cheese-Mozzarella and Ricotta. **Cheese and Fermented Milk Foods**: Volume I:Origins and Principles. 3^oed. Virginia: F.V.Kosikowski, L.L.C, vol1 , cap.11, p. 174-79,1999.

KOTIRANTA,A;LOUNATMAA,K;HAAPASALO,M. Epidemiology and pathogenesis of *Bacillus cereus* infections. **Microbes and Infection**, v.2, p189-198, 2000.

KRAMER,J.M.; GILBERT,J.M. *Bacillus cereus* and other *Bacillus* species. Ch2 , In: **Foodborne Bacterial Pathogens**. Doyle, M.P. (ED). New York: Marcel Dekker,Inc.p, 21-70,1989.

KUHN,M. GOEBEL,W. Pathogenesis of *Listeria monocytogenes*. In: RYSER E.T.; MARTH,E.H. **Listeria, Listeriosis, and Food Safety**. 2nd Ed. New York: Marcel Dekker, 1999. Cap.5,p.97-130.

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**, 4^o ed. Washington: APHA, 2001.Chap.39,p.387-403.

LIN,S.; SCHRAFT,H.; ODUMERU,J.A.;GRIFFITHS,M.W. Identification of contamination sources of *Bacillus cereus* in pasteurized milk. **International Journal of Food Microbiology**. Amsterdam.n.43,p.159-171,1998.

LINNAN,M.J.; MASCOLA,L.; LOU,X.D.; GOULET,V.; MAY,S.; SALMINEN,C.; HIRD,D.W.; YONEKURS,M.L.; HAYES,P.; WEAVER,R.; AUDURIER,A.; PLIKATIS,B.D.; FANNIN,S.L.; KLELS,A.; BROOME,C.V. Epidemic listeriosis associated with Mexican-style cheese. **New England Journal of Medicine**, Waltham,v.319, n.13,p.823-828,Sept,1988.

LOGUERCIO,A.P.;ALEIXO,J.A.G. Microbiologia de queijo tipo Minas Frescal produzido artesanalmente. **Ciência Rural**,v.31,n6, p.1063-1067,2001.

LONCAREVIC, S.; BILLE, E. B. J.; THAM, M. L. D.; THAM, W. Characterization of *Listeria* strains isolated from soft and semi-soft cheeses. **Food microbiology**. v.15, p. 521-525, 1998.

LUND,T.;GRANUM,P.E. Characterisation of a non-haemolytic enterotoxin complex from *Bacillus cereus* isolated after a foodborne outbreak. **FEMS Microbiology Letters**,v.141,n.2-3,p.151-156,aug.1996.

MADASA DO BRASIL, **Manual Completo Bacillus Diarrhoeal Via**. Mensagem recebida por luesper@fea.unicamp.br em 23 jun.2005.

MAKINO,S,I.;KAWAMOTO,K.;TAKESHI,K.;OKADA,Y.;YAMASAKI,M.;YAMAMOTO,S.;IGIMI,S. An outbreak of food listeriosis due to cheese in Japan,during 2001. **International Journal of Food Microbiology**, 104, p.189-196, 2005

MENÉNDEZ,S.;GODÍNEZ,R.;CENTENO,J.A.; OTERO-RODRÍGUEZ,J.L. Microbiological, chemical and biochemical characteristics of "Tetilla" raw cows-milk cheese. **Food microbiology**, ,18,151-158, 2001.

MODLER, H.W.; EMMONS, D.B. The use of continuous ricotta processing to reduce ingredient cost in further processed cheese products. **International Dairy Journal**. n.11 p.517-523, 2001.

MORIISHI,K.; TERAOKA,M.; KOURA,M.; INOUE,S. Sequence analysis of the *actA* gene of *Listeria monocytogenes* isolated from human. **Microbiology and Immunology**,v.42,p.129-132,1998.]

NETO,A.C.; SILVA,C.G.M.; STAMFORD,T.L.M. Staphylococcus enterotoxigênicos em alimentos in natura e processados no Estado de Pernambuco, Brasil. **Cienc. Tecnol. Alimentos**, Campinas,22(3), p.263-271, set-dez, 2002.

NORMANO,G.;FIRINU,A.; MULA,G.; DAMBROSIO,A.;POGGIU,A.; DESCATELLI,L.; IONI,R.; SCUOTA,S.; BOLZONI,G.; GIANNATALE,E.D.; SALINETTI,A.P.; SALANDRA, G.L.; BARTOLI,M.; ZUCCON,F.; PIRINO,T.; SIAS,S.; PARISI,A.; QUAGLIA,N.C.; CELANO,G.V. Coagulase-positive Staphylococci and *Staphylococcus aureus* in food products marketed in Italy. **International Journal of Food Microbiology**. N.98, p.73-79, 2005.

NOTERMANS,S.;BATT,C.A. A risk assessment approach for food-borne *Bacillus cereus* and its toxins.**Journal of Applied Microbiology**,Reading,v.84,p.51S-61S,1998 (Supplement Symposium).

OLIVEIRA,A.M. **Estafilococos enterotoxigênicos: Pesquisa de cepas produtoras e baixo produtoras de enterotoxinas isoladas de leite cru de bovino**. Campinas,1995.90p. Dissertação (Mestrado)-UNICAMP.1995

OLIVEIRA,A.M. **Investigação do comportamento de estafilococos enterotoxigênicos coagulase negativos em alimentos**. Campinas, 1999.102p. Tese (Doutorado)-UNICAMP.1999.

PAGOTTO,F.; DALEY,E.; FARBER,J.; WARBURTON,D. **Isolation of Listeria monocytogenes from all food environmental samples**. In: CANADA. Health Products Food Branch. Compendium of analytical methods: laboratory procedures of microbiological analytical of foods,[MFHPB 30] Ottawa.2001.Disponível em : www.hc-sc.gc.ca/food-aliment. Acesso em : 01/02/2005.

PENG,J.S;Tsai,W.C;CHOU,C.C.Inactivation and removal of Bacillus cereus by sanitizer and detergent. **International Journal of Food Microbiology**.n.77,p.11-18,2002.

PEREIRA,M.L. **Estafilococos coagulase negativos pauciprodutores de enterotoxinas e relato de um surto por espécie coagulase positiva**. Tese (Doutorado em Ciência dos Alimentos)- Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 1996.

PEREIRA,K.S.; PEREIRA,J.L. Estafilococos coagulase negativa: Potenciais patógenos em alimentos. **Revista Higiene Alimentar**.vol.19,n.129,p.32-34,2005.

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

PINTADO, M. E.; MACEDO, A. C.; MALCATA, F. X. Review: Technology, Chemistry and Microbiology of Whey Cheese. **Food Science Techonology International**. v.7, n.2, p.105-116, 2001.

PIRTTIJÄRVI,T.S.M.; AHONEN,L.M.; MAUNUKSELA,L.M.; SALKINOJA-SALONEN,M.S. Bacillus cereus in a whey process. **International Journal of Food Microbiology**, v.44, n.1-2,p. 31-41, oct. 1998.

RAIMUNDO, I.C. **Avaliação microbiológica de amostras de ricotas comercializadas no município de Alfenas**. 2004. 36p. Dissertação (Mestre em Ciências de Alimentos)- Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2004.

RHEINBABEN,K.E; HADLOK,R.M. Rapid distiction between micrococci and staphylococci with furazolidone agars. **Antonie van Leeuwenhoek**, n.47,p.41,51,1981.

ROCHA, J.A.K. **Estudo da presença de Listeria monocytogenes e Bacillus cereus em indústria processadora de queijo Minas frescal**. Campinas,2004.77p. Tese (Mestre em alimentos)- Faculdade de Engenharia de Alimentos), Universidade Estadual de Campinas.

ROZAND,C.V; MAZUY,C; PREVOST,G.;LAPEYRE,C.; BES,M.;BRUN,Y.; FLEURETTE,J. **International of Food Microbiology**, n 30, p 271-280, 1996.

RUSUL,G.;YAACOB,N.H. Prevalence of Bacillus cereus in select foods and detection of enterotoxin using TECRA-VIA and BCET-RPLA. **International Journal of Food Microbiology**. v.25,p.131-139,1995.

RYSER,E.T.; MARTH,E.H. Listeria,listeriosis and food safety.2.ed.NEW YORK: Marcel Dekker,1999. 738p.

SANCHEZ, G. N.; RODRIGUES, R.M.; OLVERA, P.R.; GARZA, L. M. Development of two Multiplex Polymerase chain reaction for the detection of enterotoxigenic strains of *Staphylococcus aureus* isolated from foods. **Journal of Food Protection**. v.66, n.6, p.1055-1062, 2002.

SCHOENI,J.L.;WONG,A.C.L. Bacillus cereus Food Poisoning and its Toxins. **Journal of Food Protection**,v.68,n.3,p.636-648,2005.

SHARIF,F.A.; ALAEDDINOGLU,G.A. Rapid and simple method for staining of the crystal protein of Bacillus thuringensis. **Journal of Industrial Microbiology**, v..3,p.p.227-229, 1998.

SILVA, I.M.M.; ALMEIDA, R.C.C.; ALVES, M.A.O.; ALMEIDA, P.F. Occurrence of *Listeria spp* in critical control of points and the environment of Minas frescal cheese processing. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v.81,n.03, p.241-248, Mar., 2003.

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

SILVA, W.P.; GANDRA, E.A. Estafilococos coagulase positiva: patógenos de importância em alimentos. **Revista Higiene Alimentar**. São Paulo, v.18, n. 122, p.32-39, 2004.

SIQUEIRA, I. M. C.; SOUZA, M. R.; CERQUEIRA, M. M; GLORIA. M. B. A. Importância e utilização dos derivados de soro de queijo. **Revista Higiene Alimentar**, São Paulo, v.16, n.97, p.31-35, 2002.

SOARES, C.M. ***Bacillus cereus* produtores de toxinas diarreicas em serviços de alimentação: análise da contaminação ambiental e detecção na linha de processamento de pratos cárneos** . 2004. 134p. Tese (Doutor em Tecnologia de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2004

SORIANO, J.M.; FONT, G.; RICO, H.; MOLTÓ, J. C.; MANES, J. Incidence of Enterotoxigenic *Staphylococci* and Their Toxins in Foods. **Journal of Food Protection**. v.65, n.5, p.857-860, 2002.

SOUZA,R.M.B.;RANGEL,F.F.;PENNA,C.F.A.M.;CERQUEIRA,M.M.O.P.;SOUZA, M.R. Avaliação de características físico-químicas e microbiológicas de queijo Minas frescal light comercializado em Belo Horizonte, MG. **Rev. Instituto Candido Tostes**, , v.57, n.327, p.289-291,2002.

SOUZA, M. R.; MORAIS, C. F.A.; CORRÊA, C. E. S.; RODRIGUES, R. Características Físico-Químicas em Belo Horizonte, MG. **Revista Higiene Alimentar**, São Paulo, v.14, n.73, p.68-71,2000.

SVENSSON,B.;ENEROTH,A.;BRENDHAUG,J.;CHRISTIANSSON,A. Investigation of *Bacillus cereus* contamination sites in a dairy plant with RAPD-PCR. **International Journal of Dairy Journal**, v.9,n.12,p.903-912,1999.

TAMAPURU,S.;Mc KILLIP,J.L.; DRAKE,M. Development of a Multiplex Polymerase chain reaction assay for detection and differentiation of *Staphylococcus aureus* in dairy products. **Journal of Food Protection**. V.64,n.5,p.664-668,2001.

TANIWAKI,M.H.; VAN DENDER,A.G.F. Bolores produtores de toxinas em queijos: ocorrência e significado. **Coletânea do Instituto de Tecnologia dos Alimentos**, Campinas, v.21, n.2,p.187-200,jul/dez.1991.

TANIWAKI,M.H.; SILVA,N. **Fungos em alimentos- Ocorrência e detecção**.Campinas: ITAL.82p.2001.

TATINI,S.R. Influence of foods environments on growth of *Staphylococcus aureus* and production of various enterotoxins. **Journal of Milk Food Technology**, Indiana,v.36,n.11,p.559-563,1973.

TEBALDI,V.M.R.;RAMALHO,G.C.A.;OLIVEIRA,T.L.C.; SCHWAN, R.F.; PICCOLI,R.H. Alteração microbiológica de ricota durante a vida de prateleira .In: Congresso Brasileiro de Microbiologia ,23.,2005,Santos. **Anais**. Santos: Sociedade Brasileira de Microbiologia. CD-ROM.

TOMPIKIN,R.B. Control of *Listeria monocytogenes* in the food- processing environment. **Journal of Food Protection**, Des Moines,v.65,n.4,p.709-725,Apr.,2002.

Van NETTEN, P.; MOOSDIJK, A.; HOENSEL, P.; MOSSEL, D.A.A.; PERALES, I. Pyschrotrophic strains of *Bacillus cereus* producing enterotoxin. **Journal of Applied Bacteriology** v.69, p. 73-79, 1990.

VASQUEZ-BOLAND,J.A.; KUHN,M.; BERCHE,P.; CHAKRABORTY,T.; BERNAL-DOMINGUEZ,G.; GOEBEL,W.; ZORN,B.G.; WHLAND,J.; KREFT,J. Listerial pathogenesis and molecular virulence determinants. **Clin. Microbiol.Rev.**vol14, 535-640,,july,2001.

VILJOEN,B.C. The interaction between yeast and bacteria in dairy environments. **International Journal of Food Microbiology**.69, p.37-44, 2001.

VILJOEN,B.C.; WELTHAGEN,J.J. Yeast profile in Gouda cheese during processing and ripening. **International Journal of Food Microbiology**.41, ,p.185-194, 1998.

WIEDMANN, M.; BRUCE, J.L.; KEATING,C.; JOHNSON, A.E.; Mc DONOUGH, P.L.; BATT,C.A. Ribotypes and virulence gene polymorphisms suggests three distinct *Listeria monocytogenes* lineages with difference in pathogenic potencial. **Infection and Immunity**, Washington, v.65, n.7, p.2707-2716, July, 1997.

YUN,J.J.; BARBANO,D.M. Department of Food Science, Cornell University-
september/91, Adaptação **AOAC**(1995),15^ª ed,metodologia 971.19,1995

APÊNDICE A

Lista de ingredientes e informação nutricional das 15 marcas de ricotas analisadas.

Marca A - ingr.: soro de queijo, leite pasteurizado e acidulante ácido cítrico
Porção – 50g

Valor calórico	100kcal	(4% VD)
carboidrato	0g	(0% VD)
Proteína	7g	(14% VD)
Gordura total	11g	(14% VD)
Gordura saturada	7g	(28% VD)
Colesterol	40mg	(13% VD)
Fibra	0g	(0% VD)
Cálcio	310mg	(40% VD)
Ferro	0g	(0% VD)
Sódio	160mg	(6% VD)

VD – referência em 2.500kcal.

Marca B – .: soro de queijo leite pasteurizado, ácido acético glacial
Porção – 30g

Valor calórico	35kcal	(2% VD)
carboidrato	0g	(0% VD)
Proteína	4,0g	(5% VD)
Gordura total	2,0g	(4% VD)
Gordura saturada	1,0g	(5% VD)
Gordura trans	-	-
Fibra alimentar	0g	(0% VD)
Sódio	161mg	(7% VD)

VD – referência em 2.000kcal.

Marca C - ingr.: soro de queijo leite pasteurizado, ácido láctico (acidulante), cloreto de cálcio e clorofila.

Porção – 50g

Valor calórico	100kcal	(4% VD)
carboidrato	0g	(0% VD)
Proteína	7g	(14% VD)
Gordura total	11g	(14% VD)
Gordura saturada	7g	(28% VD)
Colesterol	40mg	(13% VD)
Fibra	0g	(0% VD)
Cálcio	310mg	(40% VD)
Ferro	0g	-
Sódio	160mg	(7% VD)

VD – referência em 2.500kcal.

Marca D - ingr.: soro fresco, leite pasteurizado desnatado, ácido láctico, sorbato potássio
Porção – 50g

Valor calórico	75kcal	(3% VD)
carboidrato	0g	-
Proteína	7g	(14% VD)
Gordura total	5g	(6% VD)
Gordura saturada	3g	(12% VD)
Colesterol	26mg	(9% VD)
Fibra	0g	-
Cálcio	111mg	(14% VD)
Ferro	0g	-
Sódio	71mg	(3% VD)

VD – referência em 2.500kcal.

Marca E - ingr.: leite, fermento láctico, coalho e sal
Porção – 30g

Valor calórico	96kcal	(13,84% VD)
carboidrato	0g	-
Proteína	7,5 kcal	(15% VD)
Gordura total	7,5 kcal	(9,37% VD)
Gordura saturada	4,8g	(19,2% VD)
Colesterol	31,50mg	(10,5% VD)
Fibra	-	-
Cálcio	237mg	(23,62% VD)
Ferro	Menor que 1	Menor que 1
Sódio	258,62mg	(10,77% VD)

VD – referência em 2.500kcal.

Marca F - ingr.: soro fresco de leite, leite integral pasteurizado, cloreto de sódio e ácido cítrico
Porção – 50g

Valor calórico	100kcal	(4% VD)
carboidrato	0g	-
Proteína	7g	(14% VD)
Gordura total	11g	(14% VD)
Gordura saturada	7g	(28% VD)
Colesterol	40mg	(13% VD)
Fibra	-	-
Cálcio	910mg	(40% VD)
Ferro	0g	-
Sódio	180mg	(7% VD)

VD – referência em 2.500kcal.

Marca G - ingr.: soro de queijo, leite pasteurizado, sal, ácido láctico, hidróxido de cálcio
Porção – 50g

Valor calórico	80Kcal	(4% VD)
carboidrato	2,0g	(0,5% VD)
Proteína	6,5g	(13% VD)
Gordura total	5,5g	(7% VD)
Colesterol	-	(0% VD)
Fibra	0g	-
Cálcio	100mg	(15% VD)
Ferro	0mg	(0% VD)

VD – referência em 2.500kcal.

Marca H - ingr.: soro de leite, leite integral, sal e ácido láctico.
Porção – 30g

Valor calórico	90kcal	(4% VD)
carboidrato	2g	(1% VD)
Proteína	6g	(12% VD)
Gordura total	6g	(7% VD)
Gordura saturada	4g	(16% VD)
Colesterol	25mg	(8% VD)
Fibra	0g	-
Cálcio	103mg	(13% VD)
Ferro	0,2mg	(1% VD)
Sódio	45mg	(2% VD)
Outros minerais	1mg	-
Vitaminas	1mg	-

VD – referência em 2.500kcal.

Marca I - ingr.: soro de leite, leite pasteurizado e acidulante HII
Porção – 100g

Valor calórico	140kcal
Proteína	12,5g
Gordura	10g
Outros minerais	3,6g

VD – referência em 2.500kcal.

Marca J - ingr.: soro de leite, leite e acidulante H VIII

Porção – 30g

Valor calórico	100kcal	(4% VD)
carboidrato	0g	-
Proteína	7g	(14% VD)
Gordura total	11g	(14% VD)
Gordura saturada	7g	(28% VD)
Colesterol	40mg	(13% VD)
Fibra	0g	-
Cálcio	310mg	(40% VD)
Ferro	0g	-
Sódio	160mg	(7% VD)

VD – referência em 2.500kcal.

Marca K - ingr.: leite pasteurizado e soro

Porção – 30g

Valor calórico	40kcal
carboidrato	<1g
Proteína	4g
Gordura total	3g
Gordura saturada	-
Colesterol	-
Fibra	-
Cálcio	90mg
Ferro	-
Sódio	140mg

VD – referência em 2.500kcal.

Marca L - ingr.: soro de leite, leite pasteurizado e ácido láctico.

Porção – 50g

Valor calórico	100kcal	(4% VD)
carboidrato	0g	-
Proteína	7g	(14% VD)
Gordura total	11g	(14% VD)
Gordura saturada	7g	(28% VD)
Colesterol	40mg	(13% VD)
Fibra	0g	-
Cálcio	310mg	(40% VD)
Ferro	0g	-
Sódio	160mg	(7% VD)

VD – referência em 2.500kcal.

Marca M - ingr.: soro de leite, leite pasteurizado e sal.

Porção – 30 gr

Valor calórico	85kcal	(4% VD)
carboidrato	2g	(0% VD)
Proteína	6g	(7% VD)
Gordura total	4g	(15% VD)
Gordura saturada	6g	(13% VD)
Colesterol	25mg	(8% VD)
Fibra	0g	-
Cálcio	102mg	(13% VD)
Ferro	0,2mg	(1% VD)
Sódio	45mg	(2% VD)

VD – referência em 2.500kcal.

Marca N - ingr.: soro de leite, leite desnatado e ácido láctico.

Porção – 100 gr

Valor calórico	230kcal	(9% VD)
carboidrato	10g	(3% VD)
Proteína	9g	(12% VD)
Gordura total	23g	(29% VD)
Gordura saturada	10g	(40% VD)
Colesterol	150mg	(50% VD)
Fibra	0,7g	-
Cálcio	150mg	(13% VD)
Ferro	0,7mg	-
Sódio	40mg	(2% VD)

VD – referência em 2.500kcal.

Marca O - ingr.: soro de queijo, leite desnatado, ácido láctico, agente de firmeza cloreto de cálcio.

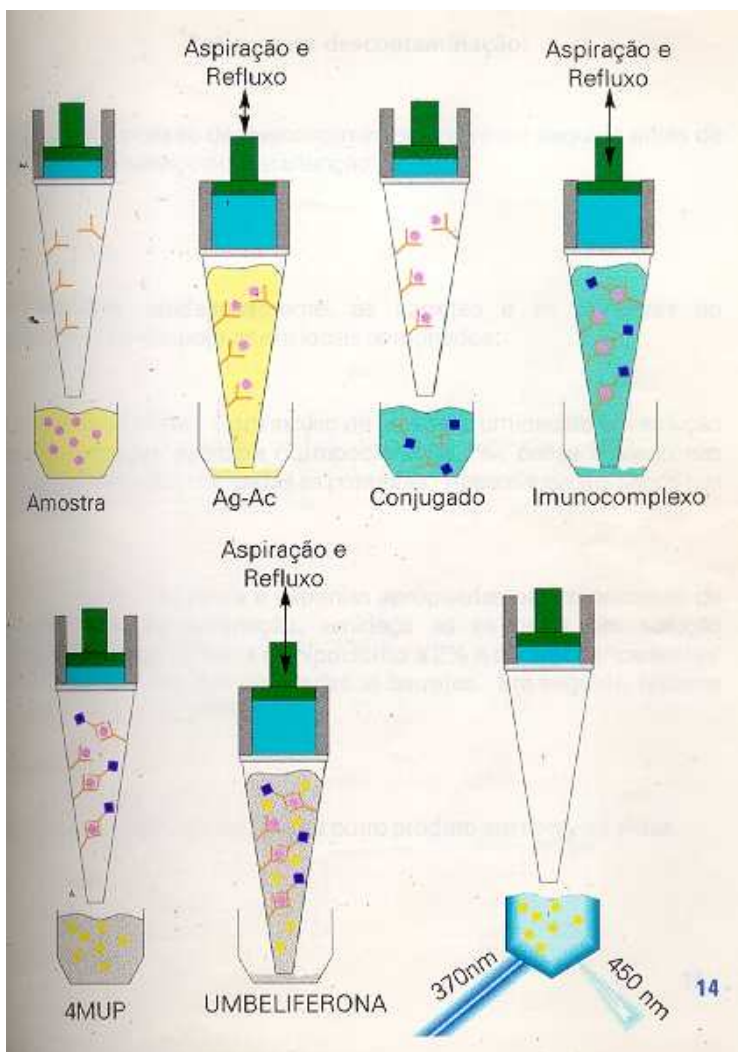
Porção – 50g

Valor calórico	50kcal	(4% VD)
carboidrato	1g	-
Proteína	3g	(4% VD)
Gordura total	3,5g	(13% VD)
Gordura saturada	2,0g	(28% VD)
Colesterol	30,0mg	(10% VD)
Fibra	0g	-
Cálcio	85mg	(11% VD)
Ferro	0	-
Sódio	0	-

VD – referência em 2.500kcal.

APÊNDICE B

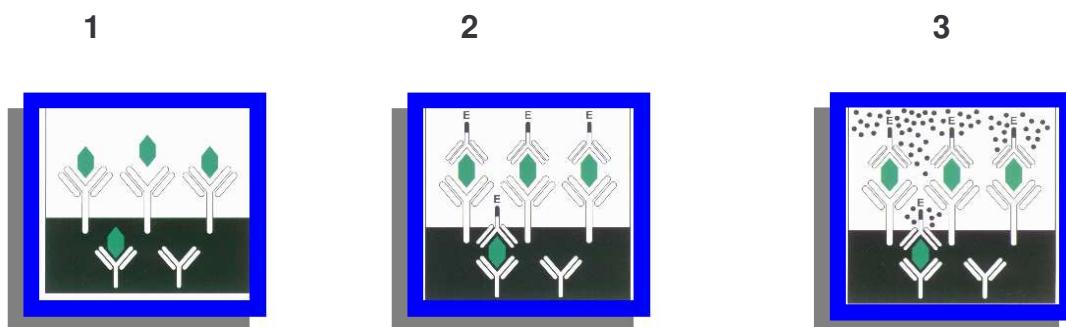
Esquema método ELFA



APÊNDICE C

Esquema teste BDE-VIA (TECRA)

Tecra BDE é um teste de ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) no formato de configuração “sandwich”, sendo a leitura dos resultados feita visualmente.

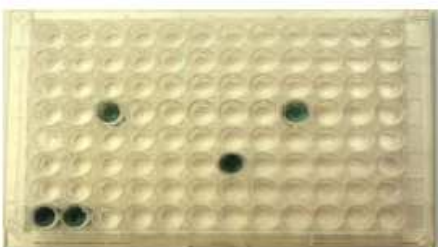


1- Anticorpos de alta afinidade para BDE estão adsorvidos nas cavidade removíveis, se houver a presença de antígenos de BDE. Presentes nas amostras previamente enriquecidas, estes serão capturados pelos anticorpos. Todo material da amostra será eliminado na lavagem.

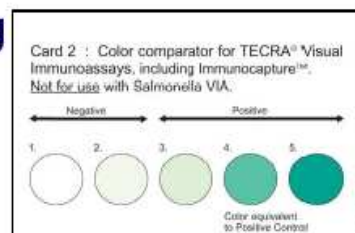
2- O sandwich é completado com a adição de enzimas ligadas a anticorpos específicos para BDE (conjugado).

3- A presença de BDE é indicada quando o conjugado converte o substrato adicionado a uma coloração verde. Na ausência de BDE, não haverá coloração verde.

Read results



♦ **Visually using colour card**



Fonte: Madasa do Brasil, 2005

APÊNDICE D

Foto do gel de eletroforese da PCR de alguns genes codificadores de enterotoxinas de *B. cereus*

M 1 2 3 4 5 6 7

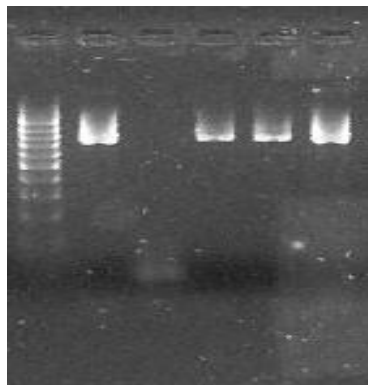
479



Coluna M : marcador de peso molecular 100bp.
1, controle positivo; **2, 3, 5, 6 e 7** isolados positivos;
4: isolado negativo
 gene *nheA*

M 1 2 3 4 5

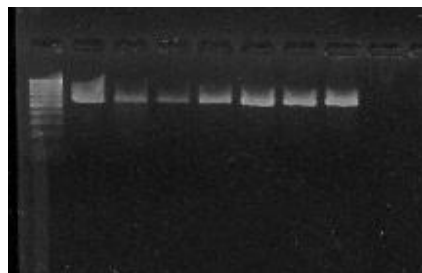
753



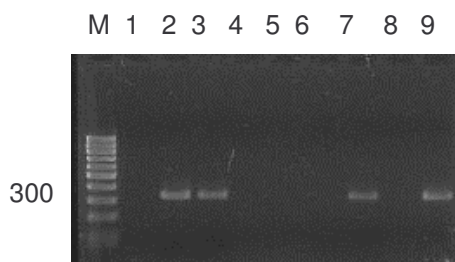
Coluna M: marcador de peso molecular 100 bp, **1** controle positivo; **2** : isolado negativo; **3, 4 e 5** isolados positivos.
 gene *nheB*

M 1 2 3 4 5 6 7 8

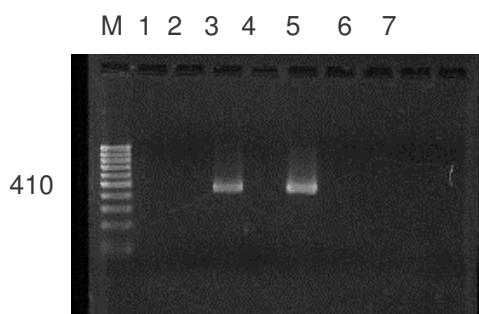
563



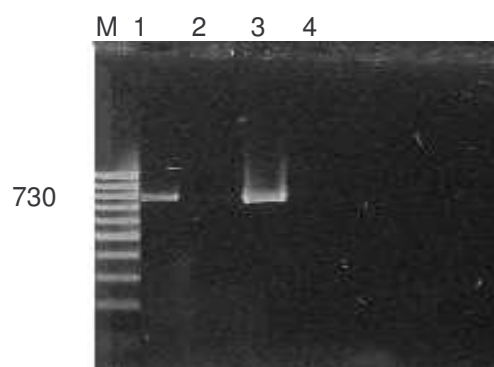
Coluna M: marcador de peso molecular 100 bp, **1** controle positivo; **2, 3, 4, 5, 6 e 7** isolados positivos, **8** isolado negativo
 gene *nheC*



Colunas: **M** marcador de peso molecular 100 bp; **9** controle positivo, **1,4,5,6, e 8** isolados negativos; **2,3 e 7** isolados positivos.
gene *hblA*



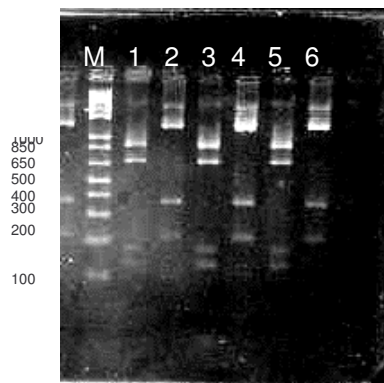
Colunas: **M** marcador de peso molecular 100 bp; **1,2,4,6 e 7** isolados negativos; **3 e 5** isolados positivos.
gene *hblD*



Colunas: **M** marcador de peso molecular 100 bp; **1** controle positivo; **2 e 4** isolados negativos; **3** isolado positivo.
gene *hblC*

APÊNDICE E

Foto do gel de eletroforese do polimorfismo alélico do *hlyA* após digestão enzimática.



Gel de eletroforese do polimorfismo alélico do *hlyA* após digestão enzimática. Colunas de número par, digestão com *Hha*I, colunas de número ímpar, digestão com *Hpa* II. Coluna M marcador 1Kb Plus DNA ladder