

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Programa de Pós-graduação em Ciência dos Alimentos
Área de Bromatologia

Influência dos coliformes no comportamento de *Listeria monocytogenes* em queijo Minas Frescal

Lina Casale Aragon-Alegro

Tese para obtenção do grau de
DOUTOR

Orientadora:
Prof^a. Dr^a. Maria Teresa Destro

São Paulo
2007

Lina Casale Aragon-Alegro

Influência dos coliformes no comportamento de *Listeria monocytogenes* em queijo Minas Frescal

Comissão Julgadora
da
Tese para obtenção do grau de Doutor

Prof^a. Dr^a. Maria Teresa Destro
Orientador/Presidente

1º examinador

2º examinador

3º examinador

4º examinador

São Paulo, ____ de _____ de 2007.

Tudo tem seu tempo determinado,
e há tempo para todo o propósito debaixo do céu:
Há tempo de nascer, e tempo de morrer;
[...]
Tempo de chorar e tempo de rir;
[...]
Tempo de buscar e tempo de perder;
[...]
tempo de estar calado e tempo de falar;
Tempo de amar e tempo de aborrecer;
tempo de guerra e tempo de paz.

(Eclesiastes 3.1-8)

Dedico

à Luísa, motivo de todo o meu esforço para querer ser sempre melhor. Amo você, filha!

à tia Lucília e ao tio Crispim, por tudo que me ensinaram em tão pouco tempo de convivência e pelo carinho enorme que sempre tiveram por nós. Vocês são muito especiais!

Agradeço

a Deus, pela sua constante presença no meu dia-a-dia.

Ao João, pelo amor, confiança e carinho. Por ter me ensinado muito, tanto no campo profissional quanto no pessoal. Obrigada por ter me ajudado no maior e melhor projeto das nossas vidas! Amo você!

à professora Maria Teresa Destro, pela amizade e por tudo que me ensinou nesse tempo em que trabalhamos juntas. E por me emprestar o sofá e os ouvidos de vez em quando.

à Ceci (em primeiro para ela não ficar brava!), Gabizinha, Tati, Katinha, Aninha e Van. Por fazerem parte da minha vida, por terem me ajudado (muito) nesse trabalho, por serem tão especiais! Amigas, vocês estarão sempre em meu coração!

à professora Bernadette Franco, pela confiança, oportunidades, amizade e pela contribuição no exame de qualificação.

à professora Mariza Landgraf, pelos ensinamentos e amizade.

à professora Susana Saad, por ter me ensinado a ser tão criteriosa na redação de artigos. E pela oportunidade de desenvolver um trabalho na área de tecnologia de alimentos.

à Izildinha Moreno, pelas valiosas contribuições no exame de qualificação.

à Patrícia Kary, pela dedicação e ajuda no início dos experimentos.

ao Vini, pela amizade, por agüentar calado tudo o que falamos para ele e pela paciência para me ensinar um pouco sobre a tão temida biologia molecular.

à Lúcia, por ter lavado tanto tubo sem me xingar. E pelos momentos de descontração.

ao pessoal do laboratório, Ângela, Cristiano, Cristina (obrigada por fazer o PFGE das minhas cepas!), Dani Horota, Danielle, Denise, Eb, Hans, Kátia Lima, Marildes, Matheus, Mônica, Paulo, Ricardo. Aprendi com cada um de vocês!

ao pessoal da SFDK, Mário, Laércio, Beatriz, Sr. Edson, Naiara e Rafael, pela ajuda com as análises de acidez e sal.

aos meus pais, Flavinho e Tequinha, pelo apoio que sempre me deram para estudar. Pelo amor enorme que têm por mim! Obrigada por tudo, inclusive pela ajuda (sempre necessária) na análise dos dados e no português! Amo vocês!

aos meus irmãos, Davi e Caio, pelo carinho e por estarem sempre pertinho de mim. Vocês são muito importantes!

aos meus sogros-pais, Roberto e Maria Helena, por terem me adotado como filha e por me defenderem sempre. Amo vocês!

ao Tavo, Lu, Fer, Martha e Alexandre, meus cunhadinhos. Vocês são muito especiais! Obrigada por tudo!

ao Francesco, meu afilhadinho, por ser tão querido e por ter nascido um pouco antes da Luísa para que eu pudesse treinar um pouco... E ao bebezinho que vem chegando por aí!

ao Ricardo e à Irene, por nos adotarem aqui em São Paulo e por sempre terem um tempinho para nós, no meio de tanta correria. Obrigada pela companhia e ajuda nos momentos mais complicados.

aos meus amigos Dri, Bel, Ping, Claudinha, Isa, Ângela e Toninho. Apesar de não nos encontrarmos tanto, sinto vocês sempre perto de mim...

aos funcionários da secretaria do Bloco 14, Tânia, Mônica, Edílson e Cléo.

aos funcionários da Secretaria de Pós-Graduação, Jorge e Elaine.

à funcionária da biblioteca, Leila Bonadio, pela correção das referências bibliográficas.

ao CNPq, pela bolsa de doutorado.

à Fapesp, pelo apoio financeiro no projeto (processo 04/05962-6).

à Purac do Brasil S.A., pela doação do ácido láctico.

à Rhodia S.A. (Danisco), em especial ao Marcelo Pedras, pela doação do fermento láctico.

RESUMO

Os queijos macios são veículos conhecidos de surtos de listeriose. Os chamados "queso blanco" ou "Latin-style fresh cheese" representam um grupo heterogêneo de queijos macios brancos e não maturados produzidos e consumidos em diferentes países da América Latina. O queijo Minas Frescal é o representante brasileiro deste grupo e pode ser produzido utilizando-se diferentes tecnologias. Vários estudos têm mostrado que a ocorrência de *Listeria monocytogenes* (Lm) em queijo Minas Frescal é muito variável, enquanto altas populações de coliformes fecais ($>10^4$ UFC/g) são muito comuns. O objetivo deste trabalho foi avaliar a influência dos coliformes no comportamento de Lm em queijo Minas Frescal produzido por acidificação direta do leite com ácido láctico e por adição de cultura láctica. Leite pasteurizado foi contaminado com Lm (10^6 UFC/g e 1UFC/g) e coliformes (10^7 UFC/g) e os queijos foram preparados seguindo-se os procedimentos de fabricação comerciais. Queijos preparados com leite contaminado somente com Lm (10^6 CFU/g e 1CFU/g) ou coliformes (10^7 UFC/g) foram utilizados como controle. As produções foram repetidas 3 vezes. Os queijos embalados em sacos de polietileno foram divididos em três grupos, sendo cada um estocado em uma das seguintes condições: 20 dias a 5°C; 20 dias a 12°C (temperatura de abuso); 8 dias a 5°C/16h seguido por 25°C/8h (para simular condições em feiras-livres). A cada 5 dias para os queijos armazenados a 5°C e 12°C, e a cada 2 dias para o outro grupo, duplicata de amostras foram retiradas e as populações de Lm, coliformes e bactérias lácticas foram determinadas utilizando-se procedimentos padrões. pH e atividade de água também foram mensurados. A inibição de Lm foi observada nos queijos em que os coliformes estavam presentes (pelo menos 1 log de diferença em cada temperatura, com exceção dos queijos preparados com ácido láctico e estocados com alternância de temperaturas). Os valores de pH e a_w não foram suficientemente baixos para causarem essa inibição, entretanto, a acidez titulável foi maior em queijo contendo coliformes. Testes em ágar tripticase de soja (TSA) contendo diferentes concentrações de ácido láctico e contaminados com Lm (10^6 UFC/g e 1UFC/g) mostraram que, quando altas concentrações de ácido láctico foram utilizadas (0,3% ou mais), a população de Lm não aumentou, indicando que o ácido láctico produzido pelos coliformes pode ser um fator importante no controle de Lm em queijo Minas Frescal. É importante ressaltar que não é nossa intenção utilizar coliformes para inibir Lm nesse tipo de queijo.

ABSTRACT

Soft cheeses are a well known cause of listeriosis outbreaks. The so called "queso blanco" or "Latin-style fresh cheese" represents a heterogeneous group of white, unripened soft cheese produced and consumed in different Latin America countries. Minas Frescal cheese is the Brazilian representative of this group and it can be produced by different technologies. Several studies have shown that *Listeria monocytogenes* (Lm) occurrence in Minas cheese is highly variable, while high population of fecal coliforms ($>10^4$ CFU/g) is very common. The objective of this study was to evaluate the influence of coliforms in the behavior of Lm in Minas Frescal cheeses produced by direct acidification of the milk with lactic acid and by the addition of a lactic culture. Pasteurized milk was spiked with Lm (10^6 CFU/g and 1CFU/g) and coliforms (10^7 CFU/g) and the cheeses were lab prepared following regular commercial procedures. Cheeses prepared with milk spiked only with Lm (10^6 CFU/g and 1CFU/g) or coliforms (10^7 CFU/g) were used as controls. The production had been repeated 3 times. The cheeses packed in polyethylene bags were divided in 3 groups and each group was stored in one of the following conditions: up to 20 days at 5°C; up to 20 days at 12°C (abuse temperature); up to 8 days at 5°C/16h followed by 25°C/8h (to simulate open market conditions). Every 5 days for cheeses stored at 5°C and 12°C, and every 2 days for the other group, duplicate samples were taken and Lm, coliforms and lactic acid bacteria population were determined using standard procedures. pH and water activity were also measured. An inhibition of Lm was observed in the cheeses when in the presence of coliforms (at least 1 log difference at any temperature, except cheeses prepared with lactic acid and stored with temperature alternation). The values of pH and a_w had not been sufficiently low to cause this inhibition, however, the titratable acidity was higher in cheeses containing coliforms. Tests in tryptone soy agar containing different concentrations of lactic acid and spiked with Lm (10^6 CFU/g and 1CFU/g) showed that when higher concentrations of lactic acid were used (0.3 % or more), the population of Lm did not increase, indicating that the lactic acid produced by coliforms may be an important factor in controlling Lm in Minas Frescal cheese. It is important to ressaltar that it is not our intention to use coliforms to inhibit Lm in this type of cheese.

1. INTRODUÇÃO

A avaliação de risco microbiológico (microbial risk assessment) – ARM - é uma forma sistemática para estimar a severidade dos perigos microbiológicos e a potencialidade de eles ocorrerem. Quando se avaliam riscos, a natureza do perigo, a probabilidade de um indivíduo ou população estar exposta a esse perigo e a de que a exposição resulte em um efeito adverso à saúde devem ser consideradas. As informações geradas durante um processo de avaliação de risco podem ser usadas para ajudar a tomar decisões relacionadas ao gerenciamento do risco (risk management); é possível, por exemplo, determinar a forma mais apropriada de prevenir ou minimizar os danos causados por aquele perigo.

A ARM é um processo com base científica, fundamentado em dados necessários para identificação de perigos, avaliação do potencial de exposição e estimativa da dose-resposta (CODEX, 1999; ICMSF, 2002). Apesar de existirem muitos trabalhos sobre os patógenos transmitidos por alimentos, tanto no exterior como em nosso país, a maioria dos dados é qualitativa e não pode ser empregada para a ARM. De acordo com o painel de especialistas convidados pelo ILSI Risk Science Institute (reunião “Data Collection for International Microbial Food Safety Risk Assessments”, realizada em Washington, em abril de 2004), para que se possa estimar o risco de ocorrência de determinadas doenças veiculadas por alimentos, há necessidade de se obterem dados quantitativos para patógenos específicos neles existentes (informação pessoal). Isso porque, para avaliar a exposição (exposure

assessment), deve-se ter uma estimativa da ocorrência do patógeno em questão (ou sua toxina) e da sua população (ou concentração), em uma porção específica de alimento, no momento do consumo, pelos diferentes grupos da população (WHO/FAO, 2003).

Esses dados podem ser obtidos por meio de estudos relacionados ao comportamento do patógeno de interesse, em um alimento específico, a fim de gerar resultados relevantes sobre a exposição da população a esse microrganismo. A determinação da capacidade de multiplicação da bactéria diante da microbiota normal do produto é essencial, assim como informações sobre propriedades físico-químicas (pH, a_w , concentração de NaCl) do alimento (FDA, 2003b).

1.1. *Listeria monocytogenes*

Dentre os patógenos veiculados por alimentos e que têm causado grande preocupação, nas últimas décadas, pode-se destacar a *Listeria monocytogenes*. A listeriose, doença provocada por esse microrganismo, embora seja rara e responsável por apenas 0,02% dos casos de doenças transmitidas por alimentos, é causa de aproximadamente 28% das mortes resultantes dessas doenças (MEAD et al., 1999) e apresenta a maior taxa de hospitalização de todas elas (MANFREDA et al., 2005). Devido a esse alto grau de severidade, particularmente entre as pessoas pertencentes ao grupo de risco (imunocomprometidos, neonatos, idosos e gestantes), enfatiza-se a necessidade de minimizar a exposição desses indivíduos à *L. monocytogenes*

Dados recentes dos EUA mostram que, em 2003, enquanto a incidência de doenças causadas por alguns patógenos de origem alimentar diminuiu (alguns sorotipos de *Salmonella* e *Escherichia coli* O157:H7), o mesmo não foi observado para *L. monocytogenes* (CDC, 2004). Esses dados indicam que, apesar da tolerância zero existente naquele país, com relação à presença de *L. monocytogenes* nos alimentos, não há evidência epidemiológica de que haja maior proteção ao consumidor.

A presença de *L. monocytogenes* em carnes cruas, aves, peixe, farinha e vegetais congelados, comercializados em Portugal, reflete a ubiquidade desse microrganismo, verificando-se altas ocorrências do patógeno: 17,7%, 60%, 16,7%, 12%, 18,5% e 12,9% de amostras positivas, respectivamente (MENA et al., 2004).

O que contribui para a transmissão da listeriose é a capacidade de a *Listeria monocytogenes* crescer em temperatura de refrigeração e em ambientes com baixa atividade de água, medidas comumente utilizadas para o controle do crescimento de patógenos em alimentos (MENA et al., 2004). *L. monocytogenes* é uma bactéria que oferece grande resistência às condições adversas, apresentando capacidade de se multiplicar em ampla faixa de pH (4,4 - 9,0) (ICMSF, 1996) e quantidades elevadas de sal (até 10%) (PATCHETT et al., 1992).

Leite e derivados são alimentos que podem transmitir a listeriose, embora, até pouco tempo atrás, os casos da doença provocados por esses produtos fossem reportados esporadicamente, afetando somente poucas pessoas. Entretanto, após alguns surtos de listeriose, associados ao consumo

de leite e produtos lácteos e envolvendo um grande número de indivíduos, *L. monocytogenes* tornou-se um microrganismo de grande preocupação para a indústria leiteira, devido à alta taxa de mortalidade. A retirada do mercado de produtos lácteos, geralmente queijos macios, contaminados pelo patógeno, é freqüente hoje em dia, com subseqüentes perdas econômicas (ARQUÉZ et al., 2005).

1.2. Surtos de listeriose

Dentre os alimentos já relacionados aos surtos de listeriose, têm-se leite cru e pasteurizado, queijos, carnes bovina, suína e de aves e seus derivados, frutos do mar, além de produtos de origem vegetal, crus ou processados, e refeições preparadas (RYSER & DONNELLY, 2001).

Os alimentos envolvidos nos surtos ou casos esporádicos são, de maneira geral, processados industrialmente, refrigerados, prontos para o consumo e com vida útil longa (FDA, 2003b).

Vários surtos de listeriose foram provocados pelo consumo de queijo contaminado, geralmente aqueles macios, frescos ou maturados, com bolores superficiais. Verificou-se que a causa da contaminação foi ou emprego de leite cru na fabricação dos produtos, ou contaminação pós-processamento (FDA, 2003a; Pintado et al., 2005).

Entre 1983 e 1987, na Suíça, ocorreram 122 casos de listeriose devido à ingestão de queijo macio Vacherin Mont d'Or (BULA et al., 1994). Em 1985,

142 casos de listeriose foram reportados em Los Angeles, Califórnia, causados pela ingestão de queijo macio tipo Mexicano, contaminado com *L. monocytogenes*. Noventa e três atingidos eram mulheres grávidas e recém-nascidos. Quarenta e oito pessoas morreram (LINNAN et al., 1988).

Em 1995, 20 casos de listeriose ocorreram na França, sendo o queijo Brie de Meaux o alimento incriminado (GOULET et al., 1995). No ano 2000, na Carolina do Norte, nos Estados Unidos, 12 casos de listeriose ocorreram devido à ingestão de queijo macio tipo Mexicano contaminado com *L. monocytogenes* (CDC, 2002).

Mais recentemente, em 2002, dois casos de listeriose foram reportados em Vancouver, Canadá. As pessoas que apresentaram meningite consumiram queijo contaminado com *L. monocytogenes* (HEALTH CANADA, 2002). Em 2003, nos Estados Unidos, pacotes de queijo tipo Minas foram recolhidos após um teste de rotina revelar a presença de *Listeria monocytogenes* neles; porém, nenhum caso de doença foi relatado associado ao consumo desse produto (FDA, 2003a).

Em 2005, em Neuemburg, na Suíça, dois idosos morreram, duas mulheres sofreram aborto e mais seis pessoas foram hospitalizadas após ingerirem queijo branco produzido com leite cru, contaminado com *L. monocytogenes* (PROMED, 2005). No início de 2007, no Canadá, uma mulher grávida ingeriu queijo produzido com leite cru, e seu bebê nasceu com listeriose (PROMED, 2007).

1.3. Queijo tipo Minas Frescal

Dentre os diferentes tipos de queijo existentes em nosso país, o Minas Frescal destaca-se por ser um produto alimentício muito consumido e freqüentemente fabricado de maneira artesanal, em muitos casos, com higiene precária. A legislação brasileira determina o uso de leite pasteurizado na elaboração de queijo Minas, com a finalidade de eliminar a flora patogênica, minimizando os riscos à saúde do consumidor (BRASIL, 1997). Porém, tanto em pequenas cidades como em grandes centros, ainda é comum a comercialização do chamado leite cru, proibida por lei desde 1952 (NERO, 2005; PEREIRA et al.,1991).

O queijo tipo Minas Frescal é definido pela legislação brasileira como sendo o queijo fresco obtido por coagulação enzimática do leite com coalho e/ou outras enzimas coagulantes apropriadas, complementada ou não com ação de bactérias lácticas específicas (BRASIL, 1997). É um queijo para o consumo imediato e de curta durabilidade no mercado, sendo produzido em fábricas de pequeno, médio e grande porte e consumido por todas as camadas da população, ao longo de todo o ano, em lanches, cafés da manhã ou sobremesas (FURTADO, 1999). Sua produção é intensa, devido ao alto rendimento e ausência de período de maturação, o que possibilita um retorno rápido de investimento e, conseqüentemente, custos menores ao consumidor (OLIVEIRA et al., 1998).

Por ser um produto alimentício com alto teor de umidade e baixo teor de sal, o queijo Minas Frescal tende a sofrer alterações em poucos dias de

exposição no mercado, as quais podem torná-lo inaceitável para o consumidor. Entre essas alterações, destaca-se a queda acentuada de pH, o que torna o produto sensorialmente ácido. Essa queda de pH é, normalmente, mais acentuada nos queijos processados com a adição de culturas láticas mesofílicas, caindo de cerca de 5,2 para menos de 4,9 após uma semana, uma vez que as culturas adicionadas degradam rapidamente a lactose presente, havendo intensa produção de ácido láctico. Queijos preparados pela adição de ácido láctico apresentam pH ao redor de 5,2-5,4, podendo variar dependendo do nível de contaminação e das condições de comercialização (FURTADO, 1999). No entanto, a supressão do uso de culturas láticas pode levar a uma tendência maior à proliferação de bactérias patogênicas e deteriorantes (CAMPOS, 2000).

Os queijos são produtos alimentícios susceptíveis a contaminações microbianas resultantes tanto do leite utilizado como matéria-prima — freqüentemente, leite cru — como de contaminações cruzadas durante o processamento e no pós-processamento. Essas contaminações podem ser de diversas origens, incluindo o ambiente de processamento, utensílios, manipuladores e matérias-primas (VARNAM & EVANS, 1991).

1.4. Ocorrência de *L. monocytogenes* em queijos macios

A ocorrência de *Listeria monocytogenes* em queijos macios é variável. Em 1988, PINI & GILBERT, pesquisando a presença de *L. monocytogenes* em

220 amostras de queijos macios fabricados no Reino Unido e em outros países, encontraram 23 amostras (10%) contaminadas com o patógeno. Em 1991, na Noruega, RORVICK & YNDESTAD analisaram 460 amostras de diferentes produtos para verificar a presença de *L. monocytogenes*. Dessas, 90 eram queijos macios importados, sendo que 10 delas (11%) foram positivas para o patógeno.

No Marrocos, EL MARRAKCHI et al. (1993) estudaram a ocorrência de *L. monocytogenes* em 227 amostras de leite e derivados, sendo que a incidência foi de 10% em leite cru e 18% em queijos. Dois anos depois, LONCAREVIC et al. (1995), na Suécia, avaliaram 333 amostras de queijos macios e semimacios, importados da Suíça, para verificar a presença de *L. monocytogenes*; constataram que o patógeno estava presente em 42% dos queijos fabricados com leite cru e em somente 2% dos preparados com leite termicamente tratado.

CORDANO & ROCOURT (2001), em Santiago, Chile, pesquisaram a presença de *Listeria monocytogenes* em 256 amostras de queijo macio e encontraram somente duas (0,8%) positivas para o patógeno.

No Brasil, assim como em outros países, a ocorrência de *L. monocytogenes* em queijo Minas Frescal varia. DESTRO et al., em 1991, analisaram 20 amostras de queijo Minas Frescal, comercializado em Campinas, SP, e encontraram *L. monocytogenes* em 10%. Em 1994, CASSAROTTI et al. não detectaram *L. monocytogenes* em 20 amostras de queijo Minas Frescal, comercializado em Piracicaba, SP.

Apesar de SILVA et al. (1998) terem encontrado *L. monocytogenes* em 41,2% dos 17 queijos Minas Frescal artesanais examinados, a porcentagem de amostras positivas para o patógeno, nos queijos industrializados, foi de 3%.

Em 2001, CORBIA et al. pesquisaram *L. monocytogenes* em 58 amostras de queijos Minas Frescal e não encontraram o patógeno. VIEIRA et al. (2001a) avaliaram 50 amostras de queijo Minas Frescal, em Araguaína, TO, e observaram que em 8% delas havia contaminação por *L. monocytogenes*.

No estudo realizado por BRANCO et al. (2003), 19 % das amostras de queijo coalho, coletadas na cidade de Fortaleza, CE, estavam contaminadas com *L.monocytogenes*.

1.5. Ocorrência de coliformes em queijos macios

Apesar de *Listeria monocytogenes* ser um dos agentes de enfermidades transmitidas por alimentos — assunto de grande interesse para a saúde pública —, podendo estar presente em queijos macios, como o Minas Frescal, nada se sabe sobre seu comportamento diante de um contaminante freqüente: os coliformes.

As bactérias do grupo coliforme são consideradas os principais agentes contaminantes associados á deterioração de queijos (OLIVEIRA et al., 1998).

A população de coliformes, geralmente, é muito alta nesse alimento, apesar de a RDC 12 (BRASIL, 2001) estabelecer, para queijos de alta ou muito alta umidade, população máxima de coliformes termotolerantes de 5×10^2 -

5×10^3 . Isso pode ser verificado em diversos trabalhos apresentados em congressos e/ou publicados em nosso país.

Em 1994, GARCIA-CRUZ et al. avaliaram a qualidade microbiológica em amostras de sete queijos Minas artesanais e três industriais, verificando que a população de coliformes fecais estava muito alta em seis e em uma delas, respectivamente. Em 1995, NASCIMENTO *et al.* analisaram 51 amostras de queijo Minas Frescal e observaram que 46 (90,2%) estavam fora dos padrões para coliformes fecais. SOUSA et al., em 1998, avaliaram 30 queijos Minas Frescal, comercializados na cidade de Belém, no Pará, encontrando 100% das amostras contaminadas com coliformes totais e fecais.

PEREIRA et al. (1999), em Belo Horizonte, MG, coletaram 168 amostras de queijo Minas, no período entre 1995 e 1996, e verificaram que 109 (64,9%) delas continham populações elevadas de coliformes fecais.

VIEIRA et al. (2001b) avaliaram a população de coliformes totais em 50 amostras de queijos comercializados em Araguaína, TO, e verificaram que 100% das amostras continham $> 10^6$ UFC desses microrganismos/g. ARAÚJO et al. (2002) verificaram que 100% das 45 amostras avaliadas de queijo macio, comercializado no Rio de Janeiro, RJ, continham coliformes totais, com populações entre 10^3 e 10^6 UFC/g.

BANDEIRA E RIBEIRO (2001) avaliaram a qualidade higiênico-sanitária de 15 amostras de queijo Minas, comercializado em feiras livres, em Pelotas, RS, e encontraram valores mínimos de 3×10^3 NMP/g para coliformes totais, sendo que *E. coli* foi encontrada em 80% das amostras.

FURTADO ET AL. (2001) analisaram 80 amostras de queijo Minas Frescal, comercializado em Rio Branco, AC; 60% apresentaram populações de coliformes termotolerantes acima de 5×10^3 UFC/g.

SILVA et al. (2002) relataram a ocorrência de populações de coliformes termotolerantes acima de 10^2 NMP/g, em 78% das amostras de queijo tipo Frescal, tanto de origem artesanal quanto industrial.

SALOTTI et al. (2006) avaliaram 60 amostras de queijo Minas Frescal, comercializado em Jaboticabal, SP, sendo 30 produzidos de maneira artesanal e 30, industrial, fiscalizados pelos Serviços de Inspeção Estadual e Federal. Os autores verificaram que 25 (83,4%) das amostras artesanais e 20 (66,7%) das industriais estavam em desacordo com o estabelecido pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). *Listeria monocytogenes* não foi encontrada nas amostras.

1.6. Interação entre microrganismos

Os alimentos, na maioria ricos em nutrientes, são geralmente capazes de suportar diferentes microrganismos. Uma complexa diversidade de interações pode ocorrer entre eles. Duas populações podem se multiplicar quando adicionadas juntas e essa multiplicação pode ser comparada com a das culturas puras. Assim, pode-se observar se ocorre algum tipo de interação entre os microrganismos e até isolar-se o composto causador dessa inibição, se for o caso (MALAKAR et al., 2003).

Entre os compostos secretados por microrganismos que podem ser responsáveis pela diminuição da taxa de crescimento de *L. monocytogenes*, destacam-se: nisina (*Lactococcus lactis*), ácido láctico (*Lactobacillus plantarum* e *Lactobacillus delbrueckii*), ácido cítrico (*Aspergillus niger*), etanol (*Saccharomyces uvarum*) e penicilina (*Penicillium chrysogenum*) (MALAKAR et al., 2003).

Em um estudo piloto, realizado em nossos laboratórios (ARAGON-ALEGRO et al., 2003), verificou-se que, em queijos Minas produzidos experimentalmente, com populações elevadas de coliformes totais (10^7 UFC/g) e *L. monocytogenes* (10^6 UFC/g), a população do patógeno manteve-se estável por até 20 dias de estocagem a 5°C. A população de coliformes também permaneceu constante até o final do período. Entretanto, quando foram preparados queijos somente com *L. monocytogenes*, houve um aumento de 2 log na população desse microrganismo, durante o período de estocagem, indicando que os coliformes podem ter alguma influência na multiplicação do patógeno.

Pelo exposto, verifica-se que há necessidade de se obterem mais informações sobre o comportamento de *L. monocytogenes* em um produto muito consumido no Brasil, a fim de se estabelecer o risco provável de esse alimento veicular populações do patógeno capazes de causar doença.

Por *L. monocytogenes* ser considerada uma bactéria de característica ubiqüitária e ser um problema para a indústria de alimentos, principalmente no que diz respeito à contaminação cruzada, devido à sua capacidade em formar

biofilmes, e também em razão das precárias condições higiênico-sanitárias de muitas plantas processadoras de queijo Minas Frescal, este estudo se faz necessário.

Apesar de o Minas Frescal ser um queijo com vida útil relativamente curta, sabe-se que, muitas vezes, ele pode permanecer no refrigerador doméstico por tempos prolongados. Assim, como não se tem o hábito de controlar a temperatura dos refrigeradores domésticos, no Brasil, é lícito supor que abusos de temperatura possam ocorrer durante essa manutenção, no refrigerador doméstico. Outro ponto a ser considerado é a comercialização de queijos Minas Frescal, sem refrigeração, em feiras livres, fato comum no País.

A combinação de fatores — como tempo e temperatura de estocagem doméstica — associada à presença da microbiota normal do produto pode ter uma influência no comportamento de *L.monocytogenes*, o que precisa ser avaliado.

2. OBJETIVO

Verificar a influência dos coliformes no comportamento de *L. monocytogenes* em queijos Minas Frescal obtidos por acidificação direta ou fermentação láctica, durante estocagem em temperaturas de refrigeração e abuso.

3. MATERIAL E MÉTODOS

Exceto quando mencionado, todos os meios de cultura utilizados foram da marca Oxoid.

3.1. Preparo da cultura de *L. monocytogenes*

Foi preparado um "pool" com três cepas de *L. monocytogenes*, uma isolada de peito de frango (15E), uma de ambiente de frigorífico de aves (30) e uma ATCC 7644 (7), pertencentes à coleção de culturas do Laboratório de Microbiologia de Alimentos – Faculdade de Ciências Farmacêuticas – Universidade de São Paulo. Cada cepa foi semeada em um tubo contendo caldo tripticase de soja (TSB) adicionado de 0,6% de extrato de levedura (YE) e incubada a 37⁰C/24h. Os caldos com os crescimentos foram misturados em um tubo Falcon e centrifugados a 1050 x g / 15 minutos / 4⁰C. As células foram lavadas com solução de cloreto de sódio (Merck) 0,85% (p/v) e a população de *L. monocytogenes* presente no caldo foi calculada por semeadura de diluições decimais em ágar tripticase de soja (TSA) adicionado de 0,6% de YE. O material foi aliquoteado em porções de 1mL e congelado com glicerol 25%, a -70⁰C, até o momento do uso.

3.2. Avaliação da diversidade genética de *L. monocytogenes*

Empregou-se o método preconizado por GRAVES & SWAMINATHAN (2001) e as enzimas ApaI e AscI, para avaliar a diversidade genética dos isolados de *L. monocytogenes* empregados neste estudo.

3.3. Isolamento e preparo da cultura de coliformes

Três peças de queijo Minas Frescal foram adquiridas nos mercados de São Paulo. Combinaram-se porções das três amostras, que foram homogeneizadas com citrato de sódio (Merck) 2% (p/v) em stomacker (1:10). Diluições seriadas foram semeadas em profundidade em ágar violeta vermelho bile glicose (VRBG), que, após solidificação, recebeu uma sobrecamada do mesmo ágar (KANG & FUNG, 1999, modificado). As placas foram incubadas a 37°C/24h. Colônias vermelho escuras com 0,5mm ou mais de diâmetro isoladas neste ágar foram semeadas em tubos contendo caldo lactose bile verde brilhante (VB) e tubo de Duhran, que foram incubados a 37°C (FENG et al., 2001). Após 48 horas, todos os caldos que apresentaram turvação e produção de gás foram misturados em tubos Falcon e os mesmos foram centrifugados a 1050 x g / 15 minutos / 4°C. As células foram lavadas com solução salina 0,85% e a população estimada após semeadura de diluições decimais em TSA-YE. O material foi congelado com glicerol 25%, a -70°C, até o momento do uso.

3.4. Determinação das espécies presentes na cultura de coliformes

Uma porção da cultura de coliformes, preparada conforme 3.2, foi semeada em caldo infusão cérebro coração (BHI) e incubada a 37°C, sob agitação (150 rpm), por três horas. Foram feitas diluições seriadas em solução

salina 0,85%, que foram semeadas em ágar McConkey e ágar VRBG contidos em placas. Foram escolhidas 51 colônias representantes dos diferentes tipos presentes nos dois ágares. Essas colônias foram semeadas em tubos contendo ágar BHI, que foram incubados a 37°C/24h. Em seguida, foram submetidas à identificação bioquímica utilizando-se os meios de cultura EPM (TOLEDO et al., 1982a), MILi (TOLEDO et al., 1982b), Citrato de Simmons e fermentação de lactose (FENG et al., 2001). Quando necessário, o API 20E (BioMérieux S.A.) foi utilizado, de acordo com o protocolo do fabricante.

3.5. Avaliação do pH do leite após adição de coliformes e enumeração da população destes durante armazenamento a 37°C

A cultura de coliformes foi adicionada ao leite, anteriormente à produção do queijo, a fim de se obter a população necessária para simular condições reais de contaminação (10^7 UFC/mL). O tempo necessário para que esta população fosse atingida foi avaliado, juntamente com a variação do pH do leite.

Uma alíquota de 1mL da cultura de coliformes foi colocada em 150mL de leite A pasteurizado e incubado a 37°C/7h. A cada hora até quatro horas e a cada 1,5 horas até sete horas, amostras foram retiradas para medida do pH em pHmetro Digimed e para a enumeração dos coliformes, empregando-se Petrifilm™ para coliformes (3M do Brasil Ltda). Outra alíquota de 150mL de leite sem adição de coliformes foi utilizada como controle.

3.6. Processamento do queijo Minas Frescal

Para o processamento do queijo Minas Frescal foi utilizado leite tipo A pasteurizado, adquirido no comércio de São Paulo. Foram empregados três tipos de contaminação em cada produção: 1) somente *Listeria monocytogenes*; 2) somente coliformes; 3) *L. monocytogenes* e coliformes juntos. A população de coliformes foi mantida constante em todas as produções (10^7 UFC/mL) e a de *L. monocytogenes* variou, sendo 10^5 UFC/mL quando se adicionou alta população e 1 célula/mL quando se adicionou baixa população. Os queijos foram acidificados por acidificação direta ou fermento láctico (dependendo da formulação), sendo, a seguir, armazenados a 5°C (ideal) e 12°C (abuso). Também foi simulada a variação que ocorre com os queijos comercializados em feiras livres. Para tanto, ciclos de temperatura (25°C/8h e 5°C/16h) foram utilizados. A Tabela 1 sumariza as diferentes combinações que foram empregadas. Cada uma das produções listadas na tabela seguinte foi repetida três vezes.

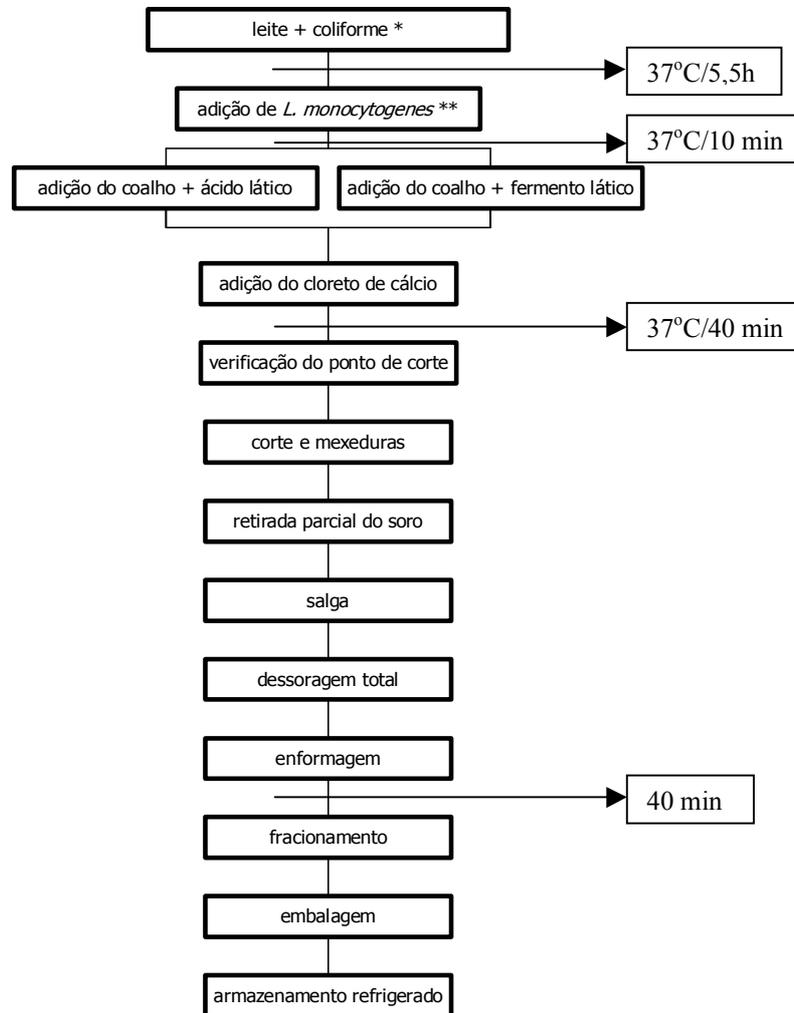
Tabela 1. Planejamento experimental das produções de queijo Minas.

Produção	Tipo de acidificação*	Tipo de contaminação**	População de <i>L. monocytogenes</i>	População de coliformes	Temperatura de armazenamento
1	1	1	10 ⁵ UFC/mL	-	5°C
	1	2	-	10 ⁷ UFC/mL	
	1	3	10 ⁵ UFC/mL	10 ⁷ UFC/mL	
2	1	1	1 célula/mL	-	5°C
	1	2	-	10 ⁷ UFC/mL	
	1	3	1 célula/mL	10 ⁷ UFC/mL	
3	1	1	10 ⁵ UFC/mL	-	12°C
	1	2	-	10 ⁷ UFC/mL	
	1	3	10 ⁵ UFC/mL	10 ⁷ UFC/mL	
4	1	1	1 célula/mL	-	12°C
	1	2	-	10 ⁷ UFC/mL	
	1	3	1 célula/mL	10 ⁷ UFC/mL	
5	1	1	10 ⁵ UFC/mL	-	5°C/16h e 25°C/8h
	1	2	-	10 ⁷ UFC/mL	
	1	3	10 ⁵ UFC/mL	10 ⁷ UFC/mL	
6	1	1	1 célula/mL	-	5°C/16h e 25°C/8h
	1	2	-	10 ⁷ UFC/mL	
	1	3	1 célula/mL	10 ⁷ UFC/mL	
7	2	1	10 ⁵ UFC/mL	-	5°C
	2	2	-	10 ⁷ UFC/mL	
	2	3	10 ⁵ UFC/mL	10 ⁷ UFC/mL	
8	2	1	1 célula/mL	-	5°C
	2	2	-	10 ⁷ UFC/mL	
	2	3	1 célula/mL	10 ⁷ UFC/mL	
9	2	1	10 ⁵ UFC/mL	-	12°C
	2	2	-	10 ⁷ UFC/mL	
	2	3	10 ⁵ UFC/mL	10 ⁷ UFC/mL	
10	2	1	1 célula/mL	-	12°C
	2	2	-	10 ⁷ UFC/mL	
	2	3	1 célula/mL	10 ⁷ UFC/mL	
11	2	1	10 ⁵ UFC/mL	-	5°C/16h e 25°C/8h
	2	2	-	10 ⁷ UFC/mL	
	2	3	10 ⁵ UFC/mL	10 ⁷ UFC/mL	
12	2	1	1 célula/mL	-	5°C/16h e 25°C/8h
	2	2	-	10 ⁷ UFC/mL	
	2	3	1 célula/mL	10 ⁷ UFC/mL	

*1) ácido láctico; 2) fermento láctico.

**1) somente *Listeria monocytogenes*; 2) somente coliformes; 3) *L. monocytogenes* + coliformes.

As principais etapas empregadas na fabricação do queijo Minas Frescal estão apresentadas na Figura 1.



* para os queijos processados somente com coliformes e com coliformes + *L. monocytogenes*

** para os queijos processados somente com *L. monocytogenes* e com coliformes + *L. monocytogenes*

Figura 1. Fluxograma do processamento do queijo Minas Frescal.

Foram separados três vasilhames onde foram adicionados 2L de leite em cada um. Em dois deles, adicionou-se 1mL da cultura de coliforme (para o preparo dos queijos somente com coliformes e com coliformes + *L.*

monocytogenes) e todos os vasilhames foram incubados a 37°C por 5,5h (tempo necessário para que a população de 10⁷ UFC/mL fosse atingida). Após esse tempo, no vasilhame em que não havia sido adicionado o coliforme e em um dos que continham coliformes foi adicionado 1mL da cultura de *L. monocytogenes* (para o preparo dos queijos somente com *L. monocytogenes* e com coliformes + *L. monocytogenes*), de modo a se obter 10⁵ UFC/mL ou 1 célula/mL, dependendo da população final desejada no queijo. Após 10 minutos a 37°C, ácido láctico (Purac do Brasil) ou fermento láctico (Ezal MAO11 – Danisco) e o cloreto de cálcio (Merck) foram adicionados. Em seguida foi adicionado o coalho “HÁ-LA” (Christian Hansen Ind. E Com. Ltda) e a mistura foi incubada a 37°C/40 minutos para que ocorresse a coagulação. O ponto de corte foi verificado, a massa foi cortada e submetida a três mexeduras de aproximadamente um minuto cada. Depois, procedeu-se a retirada parcial do soro (200mL), a salga e a dessoragem total. O queijo foi enformado e, após aproximadamente 40 minutos em temperatura ambiente, fracionado em porções de 25g, que foram acondicionadas em embalagens de polietileno (Whirl-pak, Nasco) e armazenadas nas diferentes temperaturas apresentadas na tabela 1.

O cloreto de cálcio foi adicionado na proporção de 0,25g/1L de leite. A adição de ácido láctico foi feita na proporção de 0,25mL do ácido a 85% para cada 1L de leite. O fermento láctico foi adicionado de modo a obter-se uma população de 10⁶UFC/mL no leite. Em todas as produções o coalho foi empregado na quantidade baseada no poder coagulante a 36°C – 0,05g/1L de leite (ALEGRO, 2003). A salga dos queijos foi feita com adição de sal ao soro

após a dessoragem parcial, sendo que a quantidade adicionada equivaleu a 2% do peso líquido estimado dos queijos.

Para as análises de acidez titulável e concentração de sal foram processados queijos conforme descrito anteriormente, acidificados com ácido láctico ou fermento láctico, mas somente com adição de coliformes ou sem microrganismos. Esses queijos também foram armazenados a 5°C, 12°C e com alternância de temperaturas (5°C/16h e 25°C/8h).

3.7. Análises microbiológicas

3.7.1. Amostragem

A análise microbiológica foi feita no leite, antes da adição do coalho, e em duas amostras do mesmo queijo (duplicata) refrigerado a 5 e 12°C, no dia da produção e em 5, 10, 15 e 20 dias de estocagem. Para os queijos estocados em temperaturas alternadas (25°C/8h e 5°C/16h) as análises foram feitas no dia de produção e em 2, 4, 6 e 8 dias de estocagem.

3.7.2. Preparo das amostras para análise microbiológica

Vinte e cinco gramas do queijo foram homogeneizados com 225mL de tampão fosfato (TF - Merck). Diluições decimais também foram preparadas em TF. Esse tampão foi utilizado, ao invés do citrato de sódio 2% (recomendado para análise desse tipo de queijo), por ser o sugerido no manual de instruções da 3M para a utilização do Petrifim™ para coliformes.

3.7.3. Enumeração de *Listeria monocytogenes* (PAGOTTO et al., 2001)

Diluições decimais preparadas conforme 3.6.2 foram semeadas em profundidade em ágar OXFORD (aproximadamente 20mL). As placas foram incubadas a 37⁰C/24h, as colônias negras foram contadas e a população calculada.

3.7.4. Enumeração de coliformes (KORNACKI & JOHNSON, 2001)

As diluições decimais preparadas conforme 3.6.2 foram semeadas em placas PetrifilmTM para coliformes e incubadas a 37⁰C. Após 24 h, as colônias avermelhadas associadas a bolhas de gás foram contadas e a população calculada.

3.7.5. Enumeração de bactérias lácticas (HALL et al., 2001)

As diluições decimais preparadas conforme 3.6.2 foram semeadas em profundidade em 20mL de ágar de Man, Rogosa e Sharp (MRS) e incubadas a 37⁰C. Após 48 h, as colônias foram contadas e a população calculada.

3.8. Análises físico-químicas

3.8.1. Monitoramento da Atividade de Água (a_w)

A cada dia de amostragem foi avaliada a a_w em um pedaço de queijo para cada tipo de produção. Foi empregado o aparelho Novasina a_w Center (Novasina AG, Zürich, Switzerland).

3.8.2. Monitoramento do pH

Em cada dia de amostragem foi feita a avaliação do pH em um pedaço de queijo para cada tipo de produção, com auxílio de fitas Spezialindikator (Merck), na faixa de 4,0 a 7,0. Também foi avaliado o pH em um pedaço de cada queijo produzido para as análises de acidez titulável e concentração de sal, nos dias 0, 5, 10, 15 e 20 para os queijos armazenados a 5°C e 12°C e nos dias 0, 2, 4, 6 e 8 para os queijos armazenados com alternância de temperaturas (5°C/16h e 25°C/8h).

3.8.3. Monitoramento da acidez titulável (BRASIL, 2003)

A acidez titulável foi avaliada em um pedaço de cada tipo de queijo nos dias 0, 5, 10, 15 e 20 para os queijos armazenados a 5°C e 12°C e nos dias 0, 2, 4, 6 e 8 para os queijos armazenados com alternância de temperaturas (5°C/16h e 25°C/8h). Dez gramas da amostra foram transferidos para um béquer de 150mL, onde foram adicionados 50mL de água morna (40°C) isenta de gás carbônico. Utilizando-se um bastão de vidro foi realizada agitação até a dissolução possível. A solução foi filtrada e transferida para um balão volumétrico de 100mL, foi resfriada em água corrente e o volume foi completado. Uma alíquota de 50mL foi transferida para um béquer de 150mL, onde se adicionou 10 gotas de solução alcoólica de fenolftaleína a 1%. A solução foi titulada com hidróxido de sódio 0,1N até obter-se uma leve coloração rósea persistente por aproximadamente 30 segundos. O cálculo da porcentagem em ácido láctico foi feito multiplicando-se o volume gasto da

solução de hidróxido de sódio 0,1N, pelo fator de correção dessa solução e por 0,9 (fator de conversão do ácido láctico) e dividindo-se esse valor pela massa da amostra na alíquota, em gramas.

3.8.4. Monitoramento da concentração de cloreto de sódio (BRASIL, 2003)

A concentração de cloreto de sódio foi avaliada em um pedaço de cada tipo de queijo no dia 20 para os queijos armazenados a 5°C e 12°C e no dia 8 para os queijos armazenados com alternância de temperaturas (5°C/16h e 25°C/8h). Um cadinho de porcelana foi aquecido em forno mufla a 550°C durante 30 minutos, esfriado em dessecador e tarado. Em uma balança analítica, foram pesados em torno de 2g da amostra homogeneizada. O cadinho com a amostra foi levado ao bico de Bunsen até a carbonização completa e, a seguir, ao forno mufla em temperatura não superior a 550°C, para evitar-se a perda de cloretos. O material foi incinerado até obterem-se cinzas brancas, esfriado em dessecador e pesado. O resíduo foi transferido para um erlenmeyer de 125mL, utilizando-se cerca de 50mL de água morna. Adicionou-se 1mL de solução de cromato de potássio a 5% e titulou-se com solução de nitrato de prata 0,1N, até obter-se uma coloração vermelho tijolo. O cálculo da concentração de cloretos foi feito multiplicando-se o volume da solução de nitrato de prata 0,1N gasto na titulação pelo fator de correção dessa solução, pela normalidade dessa solução, por 0,0585 (miliequivalente-grama do cloreto de sódio) e por 100, e dividido pela massa da amostra.

3.9. Avaliação, em ágar, da sensibilidade de *L. monocytogenes* aos coliformes, bactérias lácticas ou a compostos produzidos por eles

As culturas utilizadas nesses testes foram a de *L. monocytogenes*, preparada como descrito no item 3.1 e a de coliformes, descrita no item 3.3. A verificação *in vitro* da inibição de *L. monocytogenes* por coliformes foi realizada empregando-se dois métodos.

O primeiro foi o de difusão em poços, descrito por DORMAN & DEANS (2000). Em uma placa de Petri, transferiu-se uma alíquota de 1mL da cultura de *L. monocytogenes* (10^7 UFC/mL) e adicionou-se 20mL de TSB contendo 1% de ágar. Após homogeneização e solidificação do meio, com auxílio de ponteiros descartáveis de 1mL foram perfurados poços de aproximadamente 8 a 9mm de diâmetro. Uma alíquota de 30 μ L da cultura de coliformes com população de 10^7 UFC/mL foi aplicada nos poços. As placas foram incubadas a 37 $^{\circ}$ C durante 24h e, em seguida, foram analisadas quanto à formação de halos de inibição. Os halos são medidos com auxílio de paquímetro.

O método da gota (FARIAS et al., 1994) foi o segundo utilizado. Adicionou-se, em placas de Petri, 20mL de TSB + 1,5% de ágar. Após a solidificação, três alíquotas de 5 μ L da cultura de coliformes (10^7 UFC/mL) foram utilizadas para se fazer três "spots" na superfície do ágar. As placas foram incubadas a 37 $^{\circ}$ C. Após 24h, recobriu-se a placa com uma sobrecamada de TSB + 0,75% de ágar contendo 20 μ L da cultura de *L. monocytogenes* (10^7 UFC/mL). As placas foram então incubadas a 37 $^{\circ}$ C durante 24h e, em

seguida, foram analisadas quanto à formação de halos de inibição. Os halos são medidos com auxílio de régua.

Para a verificação da sensibilidade de *L. monocytogenes* a algum composto produzido por coliformes também foram utilizados dois métodos.

O primeiro foi o de antagonismo simultâneo por inoculação em poços descrito por TAGG & McGIVEN (1971), sem a viragem do ágar (BENKERROUM et al., 1993). Adicionou-se, em placas de Petri, uma alíquota de 1mL da cultura de *L. monocytogenes* (10^7 UFC/mL) e 20mL de TSB-YE + 1,5% de ágar. Após homogeneização e solidificação do ágar, foram perfurados poços conforme anteriormente descrito. Uma alíquota de 1mL da cultura de coliformes com população de 10^7 UFC/mL foi centrifugada e o sobrenadante foi aplicado nos poços (30 μ L). As placas foram incubadas a 37⁰C durante 24h e, em seguida, foram analisadas quanto à formação de halos de inibição. Os halos são medidos com auxílio de paquímetro.

O método da gota (FARIAS et al., 1994) também foi utilizado. Adicionou-se, em placas de Petri, 20mL de TSB + 1,5% de ágar. Após a solidificação, três alíquotas de 5 μ L da cultura de coliformes (10^7 UFC/mL) foram utilizadas para se fazer três "spots" na superfície do ágar. As placas foram incubadas a 37⁰C. Após 24h, as placas foram expostas ao vapor de clorofórmio por 30 minutos em capela e entreabertas por igual período de tempo, para evaporação do clorofórmio residual. Em seguida, recobriu-se a placa com uma sobrecamada de 10mL de TSB + 0,75% de ágar contendo 20 μ L da cultura de *L. monocytogenes* (10^7 UFC/mL). As placas foram incubadas a 37⁰C durante 24h

e, em seguida, foram analisadas quanto à formação de halos de inibição. Os halos são medidos com auxílio de régua.

Para a avaliação da sensibilidade de *L. monocytogenes* às bactérias lácticas ou aos seus compostos, empregou-se os mesmos métodos descritos para os coliformes, só que se utilizando a cultura de bactérias lácticas usada no preparo dos queijos (item 3.6).

3.10. Avaliação da sensibilidade de *L. monocytogenes* aos coliformes em caldo

Foram preparados cinco frascos contendo 50mL de caldo TSB-YE. As culturas utilizadas nesse teste foram a de *L. monocytogenes*, preparada como descrito no item 3.1 e a de coliformes, descrita no item 3.3.

A adição das culturas aos frascos contendo TSB-YE foi feita da seguinte maneira: 1) 1mL da cultura de coliformes (10^7 UFC/mL); 2) 1mL da cultura de coliformes (10^7 UFC/mL) + 1mL da cultura de *L. monocytogenes* (10^7 UFC/mL); 3) 1mL da cultura de coliformes (10^7 UFC/mL) + 1mL da cultura de *L. monocytogenes* (1UFC/mL); 4) 1mL da cultura de *L. monocytogenes* (10^7 UFC/mL); 5) 1mL da cultura de *L. monocytogenes* (1UFC/mL). A população de coliformes foi estimada nos caldos onde esses microrganismos foram adicionados (1, 2 e 3) e a de *L. monocytogenes*, nos caldos 2, 3, 4 e 5. Essa enumeração foi realizada imediatamente após a adição do inóculo e a cada hora, durante armazenamento a 37°C, até o tempo de 10 horas. Esse procedimento também foi realizado após 24h de incubação à mesma

temperatura. Diluições seriadas em solução salina 0,85% foram semeadas em profundidade em ágar TSA-YE. Após incubação das placas a 37°C durante 24h, as colônias foram contadas e as populações, estimadas.

3.11. Avaliação da sensibilidade de *L. monocytogenes* ao ácido láctico

Foram preparados 10 frascos contendo 50mL de caldo TSB-YE. Cada dois frascos contendo o caldo foram adicionados de diferentes concentrações de ácido láctico, de modo a obterem-se caldos contendo 0,1%, 0,3%, 0,6% e 1,1% de ácido láctico. Esses valores de % de ácido láctico foram os mais freqüentemente observados nos resultados do item 3.8.3. Dois frascos não adicionados de ácido láctico foram utilizados como controle. A um conjunto de frascos representativos das diferentes concentrações de ácido láctico e controle adicionou-se 1mL da cultura de *L. monocytogenes* com população de 10^7 UFC/mL (item 3.1). Ao outro conjunto adicionou-se 1mL da cultura de *L. monocytogenes* com população de 1UFC/mL. A população de *L. monocytogenes* foi estimada logo após a adição do inóculo e após 6, 12, 24 e 32 horas de estocagem a 37°C. Diluições seriadas em solução salina 0,85% foram semeadas em profundidade em ágar TSA-YE. Após incubação das placas a 37°C durante 24h, as colônias foram contadas e a população, estimada.

3.12. Análise dos resultados

Para a avaliação estatística dos dados, inicialmente foi realizada uma análise exploratória dos mesmos. Para se atingir o objetivo foi proposto um modelo de efeitos mistos (LITTEL et al., 1996). Quando as suposições residuais não foram atendidas, uma transformação foi aplicada a cada variável resposta. Foi utilizado o procedimento PROC MIXED do software SAS versão 8.02. Os resultados foram apresentados em tabelas contendo média, desvio padrão, coeficiente de variação, 1º quartil, mediana e 3º quartil dos valores obtidos nas produções, que estão apresentadas no anexo I. As comparações entre os valores foram apresentadas em tabelas contendo estimativa, erro padrão e P-valor (anexo II).

Para facilitar a análise dos dados, gráficos demonstrando o comportamento dos microrganismos foram construídos e os resultados da análise estatística, comentados.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Cultura de *L. monocytogenes*

A população obtida para a cultura de *Listeria monocytogenes* foi de $1,2 \times 10^7$ UFC/mL. A contagem foi repetida a cada mês de congelamento para se

saber se a população diminuiu, mas ela manteve-se sempre em torno de 10^7 UFC/mL.

Com a utilização da PFGE pôde-se observar que as três cepas utilizadas apresentam perfis moleculares diferentes, o que era desejado. Empregando-se o teste de antagonismo simultâneo por inoculação em poços verificou-se que não há inibição de uma cepa por outra, entre as três cepas da cultura de *L. monocytogenes*.

4.2. Cultura de coliformes

A população obtida para a cultura de coliformes foi de $5,7 \times 10^7$ UFC/mL e esta se manteve constante durante o armazenamento a -70°C , conforme também verificado para *L. monocytogenes*.

4.3. Determinação das espécies presentes na cultura de coliformes

Das 51 cepas avaliadas, 44 (86,3%) foram identificadas como *Escherichia coli*, 3 (5,9%) como *Citrobacter diversus*, 2 (2,9%) como *Citrobacter freundii*, 1 (2%) como *Serratia liquefaciens* e 1 (2%) como *Klebsiella oxytoca*.

4.4. Avaliação do pH do leite após adição de coliformes e enumeração da população destes durante armazenamento a 37°C

Na tabela 2 observam-se os valores de pH e as populações de coliformes obtidas após incubação dos leites a 37°C por até 7h.

Tabela 2. Valores de pH e população de coliformes inoculados em leite e mantidos a 37°C.

Tempo	Leite sem coliformes		Leite com coliformes	
	pH	População de coliformes (UFC/mL)	pH	População de coliformes (UFC/mL)
0h	6,70	<10	6,70	$6,0 \times 10^4$
1h	6,67	<10	6,67	$1,5 \times 10^5$
2h	6,60	<10	6,63	$1,0 \times 10^5$
3h	6,58	<10	6,61	$1,0 \times 10^5$
4h	6,59	<10	6,60	$1,0 \times 10^6$
5,5h	6,60	<10	6,46	$1,3 \times 10^7$
7h	6,60	<10	6,25	$1,3 \times 10^8$

Verificou-se que não houve diminuição acentuada dos valores de pH do leite pelos coliformes durante as 7 horas de avaliação, a ponto de prejudicar os experimentos. Também se pôde observar que 5,5 horas após os coliformes terem sido adicionados ao leite foi atingida a população desejada para este trabalho. Assim, antes do processamento dos queijos, os leites que seriam utilizados para produzir queijos com coliformes foram adicionados da cultura desses microrganismos, preparada conforme descrito em 3.2, e armazenados a

37°C durante 5,5h. Os leites utilizados para o preparo dos queijos contendo somente *Listeria* também foram armazenados à mesma temperatura, durante o mesmo período de tempo.

A fim de facilitar o entendimento da discussão que se segue, utilizar-se-á as seguintes nomenclaturas: **produção** significa cada processamento dos queijos; **formulação** significa cada tipo de queijo elaborado em uma produção, sendo L (somente com *L. monocytogenes*), C (somente com coliformes) e LC (com *L. monocytogenes* e coliformes); **população baixa de *L. monocytogenes*** é 1UFC/mL; **população alta de *L. monocytogenes*** é 10⁵UFC/mL; **acidificação** significa a forma de acidificação do leite no processamento dos queijos, sendo eles ácido láctico (AL) e fermento láctico (FL). Nas figuras, cada ponto representa a média de duas amostras de queijo examinadas para cada uma das três repetições de produção.

4.5. Variação do pH durante armazenamento do queijo Minas Frescal

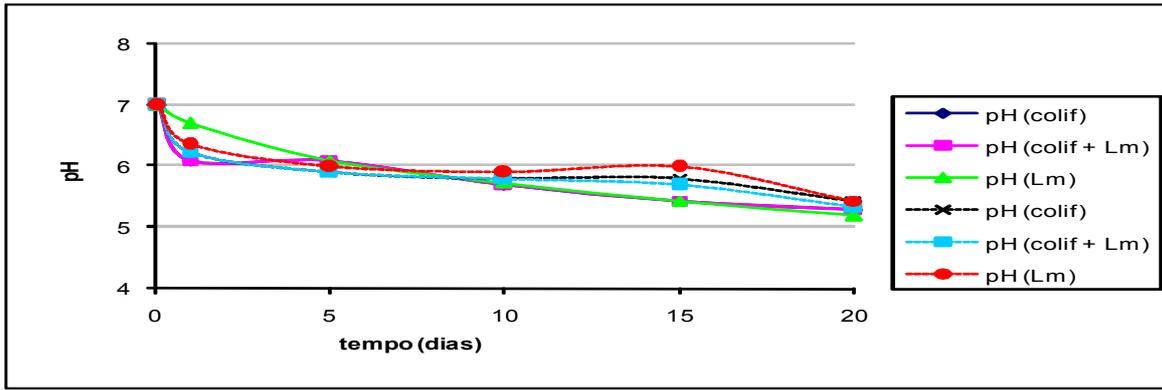
Os valores de pH obtidos em queijos produzidos com ácido láctico variaram de 7,0 a 5,0, e com fermento láctico, de 7,0 a 4,7. Esses valores (médias de três produções) encontram-se nas figuras 2 e 3.

Durante o tempo de armazenamento, a queda de pH foi relativamente acentuada, porém, os valores finais não foram tão baixos a ponto de serem considerados um fator limitante para a proliferação das bactérias estudadas. Segundo BERESFORD et al. (2001), o pH ótimo para a multiplicação da maioria

das bactérias é em torno do neutro e a multiplicação destas é deficiente em valores menores que 5,0.

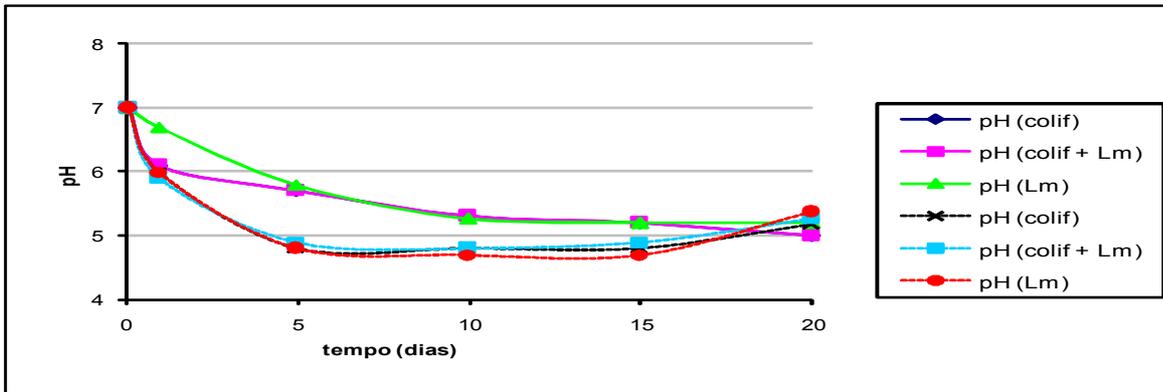
Em todos os queijos avaliados o valor do pH diminuiu durante o tempo de armazenamento, porém, raramente ficou abaixo de 5,0. Observaram-se valores de pH entre 4,7 e 5,0 nos queijos produzidos com fermento láctico e alta população de *L. monocytogenes* quando armazenados a 12°C e nos com baixa população de *L. monocytogenes* armazenados a 5°C e naqueles em alternância de temperaturas.

De maneira geral, queijos acidificados com ácido láctico apresentaram valores de pH maiores que os queijos acidificados com fermento láctico ($p < 0,05$). Isso acontece porque a quantidade de ácido produzida pelas bactérias lácticas do fermento aumenta durante o tempo de armazenamento, abaixando os valores de pH. Quando o queijo é acidificado diretamente com ácido láctico, essa quantidade de ácido tende a permanecer constante, não variando muito o pH. A diminuição dos valores de pH em queijos produzidos com acidificação direta pode também ser influenciada pela produção de ácidos pela microbiota natural do leite, o que ocorre também nos queijos produzidos com fermento láctico.



(a)

(b)



(c)

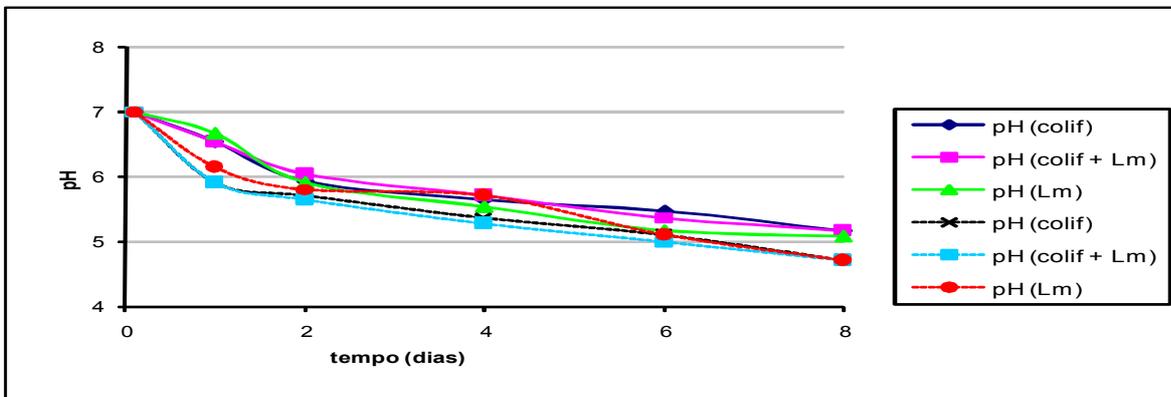


Figura 2. Valores de pH no leite (tempo 0) e em queijos Minas Frescal produzidos com alta população de *L. monocytogenes* (10^5 UFC/mL), ácido láctico (linhas cheias) e fermento láctico (linhas pontilhadas), armazenados a 5°C (a), 12°C (b) e 5°C/16h e 25°C/8h (c). Cada ponto representa a média de duas amostras de queijo examinadas para cada uma das três repetições de produção. Lm = *Listeria monocytogenes*; colif = coliformes.

Comparando-se os dois tipos de acidificação (ácido láctico e fermento láctico), em queijos armazenados a 5°C e com alta população de *L. monocytogenes* (figura 2a), pode-se observar que os queijos somente com *L. monocytogenes* (L), no 15º dia de armazenamento, apresentaram valores de pH mais elevados quando acidificados com fermento láctico do que com ácido láctico, sendo que essa diferença foi significativa estatisticamente ($p < 0,05$). Em todos os outros casos não houve diferença ($p > 0,05$) entre esses parâmetros, nesta mesma temperatura.

BURITI et al. (2005a) prepararam queijos Minas frescal com adição de ácido láctico e de cultura láctica. Os autores verificaram que, em todos os queijos, os valores de pH diminuíram durante o armazenamento, porém, essa diminuição foi significativa estatisticamente somente nos queijos produzidos com adição de cultura láctica. Segundo esses autores, apesar da tendência de se substituir parcial ou totalmente a utilização de culturas lácticas por ácido láctico nos queijos brasileiros, somente a adição das culturas assegura a permanente produção de ácido láctico e, conseqüentemente, valores mais baixos de pH dos produtos durante o armazenamento. Os autores ainda comentam que a adição do ácido láctico promove uma diminuição do pH que é restrita ao processo de manufatura dos queijos.

Para os queijos armazenados a 12°C (figura 2b) observou-se diferença ($p < 0,05$) nos valores de pH, comparando-se os tipos de acidificação entre as três formulações (L, LC e C) nos dias 5 e 10 e entre os queijos L e C no 15º dia de armazenamento.

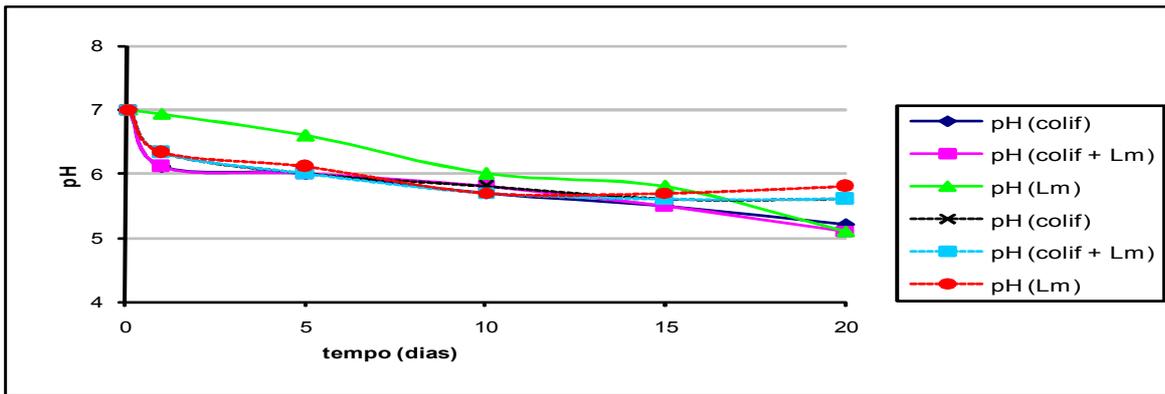
Nos queijos armazenados com alternância de temperatura (figura 2c), embora não seja bem visível no gráfico, verificou-se diferença estatística ($p < 0,05$) entre os dois tipos de acidificação em todas as formulações, no leite e nos queijos armazenados há 2, 4, 6 e 8 dias. No dia da produção observou-se diferença estatística significativa ($p < 0,05$) somente entre queijos L. Nesses casos, os valores de pH foram mais baixos em queijos produzidos com fermento láctico e mais altos quando produzidos com ácido láctico. Isso aconteceu, provavelmente, porque a alternância de temperaturas de armazenamento permitiu a maior multiplicação das bactérias presentes no fermento láctico e, conseqüentemente, maior fermentação de lactose por essas bactérias, produzindo mais ácido láctico e abaixando o pH (BERESFORD et al., 2001).

Comparando-se o efeito das temperaturas de armazenamento (figuras 2a e 2b), verificou-se que os valores de pH, em um mesmo tempo, foram menores em várias amostras de queijos armazenados a 12°C, quando comparados com as armazenadas a 5°C. Essa diferença foi estatisticamente significativa ($p < 0,05$) nos queijos L, LC e C produzidos com fermento láctico nos dias 5, 10 e 15 de armazenamento, nos queijos LC e C produzidos com ácido láctico no dia 5 e também nas três formulações produzidas com ácido láctico no dia 10. É provável que essa diminuição do pH seja decorrente da maior multiplicação dos coliformes e das bactérias lácticas, devida à temperatura abusiva de armazenamento (12°C).

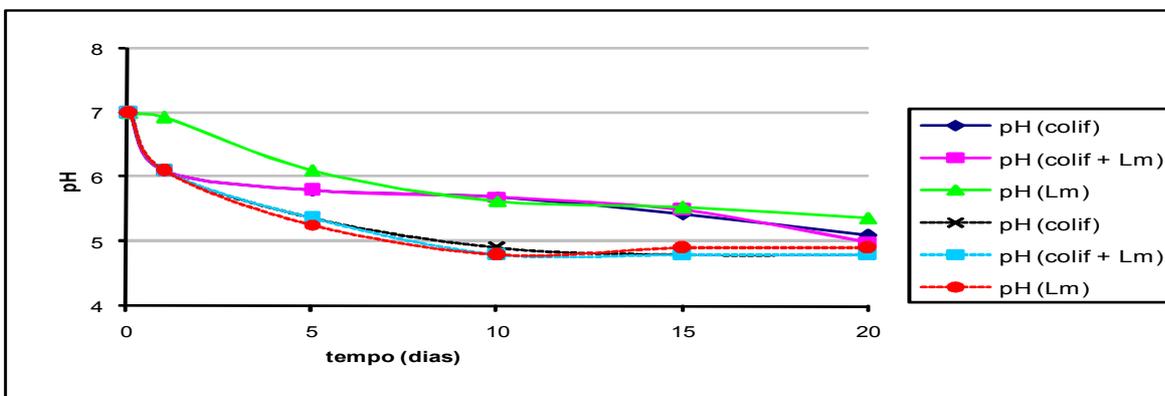
Comparando-se as três formulações de queijos (L, LC e C) em cada temperatura de armazenamento, verifica-se que os queijos somente com

Listeria tendem a apresentar valores mais altos de pH. Isso foi significativo estatisticamente ($p < 0,05$) apenas entre os queijos L e LC, produzidos com ácido láctico e armazenados tanto a 5 quanto a 12°C e entre os queijos L e C, produzidos com fermento láctico e também armazenados nas mesmas temperaturas. Os valores menores de pH em queijos contendo coliformes devem-se provavelmente à produção de ácido por esses microrganismos, através da utilização da lactose.

a)



(b)



(c)

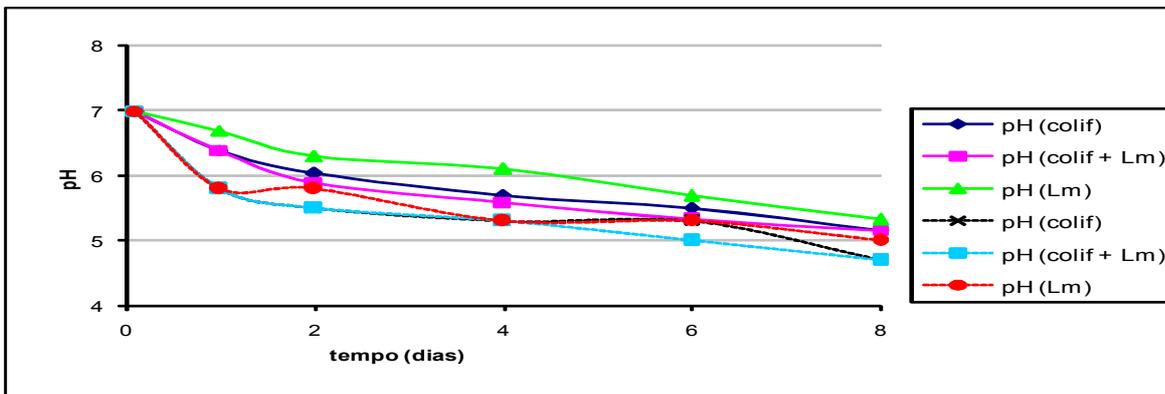


Figura 3. Valores de pH no leite (tempo 0) e em queijos Minas Frescal produzidos com baixa população de *L. monocytogenes*, ácido láctico (linhas cheias) e fermento láctico (linhas pontilhadas), armazenados a 5°C (a), 12°C (b) e 5°C/16h e 25°C/8h (c). Cada ponto representa a média de duas amostras de queijo examinadas para cada uma das três repetições de produção. Lm = *Listeria monocytogenes*; colif = coliformes.

Na figura 3 pode-se observar que os valores de pH, em todos os queijos produzidos com baixa população de *L. monocytogenes* (1 UFC/mL), também

diminuíram durante o tempo de armazenamento, sendo essa diminuição estatisticamente significativa ($p < 0,05$) em todas as produções.

Comparando-se os tipos de acidificação entre os queijos armazenados a 5°C (figura 3a), observa-se que os valores de pH dos queijos L foram maiores quando produzidos com ácido láctico do que com fermento láctico, invertendo-se esse comportamento somente no último tempo de análise (dia 20). Porém, essa diferença só foi significativa ($p < 0,05$) nos dias 5 e 20. No dia 20, os queijos C e LC também apresentaram valores de pH diferentes estatisticamente ($p < 0,05$) quando comparados os tipos de acidificação; as amostras produzidas com ácido láctico apresentaram menores valores de pH do que as produzidas com fermento láctico, o que não era esperado.

Já nos queijos L armazenados a 12°C (figura 3b), os valores de pH foram diferentes significativamente ($p < 0,05$) em todos os tempos de análise, sendo que as amostras produzidas com ácido láctico apresentaram sempre valores maiores quando comparadas com as produzidas com fermento láctico. Pode-se observar que nos dias 5, 10 e 15 de armazenamento isso também ocorreu com os queijos C e LC. Para os queijos armazenados com alternância de temperaturas (figura 3c), foi verificada diferença significativa ($p < 0,05$) entre os tipos de acidificação para os três tipos de formulação (L, LC e C), durante todo o tempo, com exceção dos valores observados no leite logo após a contaminação com *L. monocytogenes*.

Comparando-se os queijos produzidos com fermento láctico armazenados a 5°C e a 12°C (figuras 3a e 3b), pode-se dizer que os valores de pH foram

sempre menores ($p < 0,05$) nas amostras que ficaram sob temperatura de abuso, indicando talvez um aumento na população de bactérias lácticas neste caso e, conseqüentemente, um aumento na produção de ácido, abaixando os valores de pH. Já no caso dos queijos produzidos com ácido láctico foi observada diferença significativa ($p < 0,05$) apenas nos queijos L, em 5 e 10 dias de armazenamento.

Comparando-se as três formulações de queijo (L, LC e C) em cada temperatura de armazenamento, verifica-se também que os queijos somente com *Listeria* tendem a apresentar valores mais altos de pH, sendo esta diferença estatisticamente significativa na maioria dos casos. Isso se deve, provavelmente, à produção de ácido láctico pelos coliformes.

4.6. Variação da atividade de água (a_w) durante armazenamento do queijo Minas Frescal

Os valores de a_w observados em nosso trabalho não foram menores do que 0,975, 0,971 e 0,971 para queijos armazenados a 5°C, 12°C e com alternância de temperatura (5°C/16h e 25°C/ 8h), respectivamente. Valores elevados como esses não inibem o crescimento de bactérias no alimento. Segundo LOU & YOUSEF (1999), *L. monocytogenes* tem a capacidade de se multiplicar em atividade de água tão baixa quanto 0,90.

Durante o tempo de armazenamento, os valores de a_w dos queijos apresentaram queda. Um exemplo desse comportamento pode ser observado na figura 4. Todas as curvas com os valores obtidos para o parâmetro a_w foram

semelhantes à dessa figura em todos os queijos, com exceção dos produzidos com ácido láctico e população alta de *L. monocytogenes* e armazenados com alternância de temperaturas. Neste caso não se observou diminuição dos valores de a_w durante o tempo de armazenamento (figura 5). É interessante observar também que esses últimos foram os únicos queijos que apresentaram valores de a_w mais baixos desde o dia da produção.

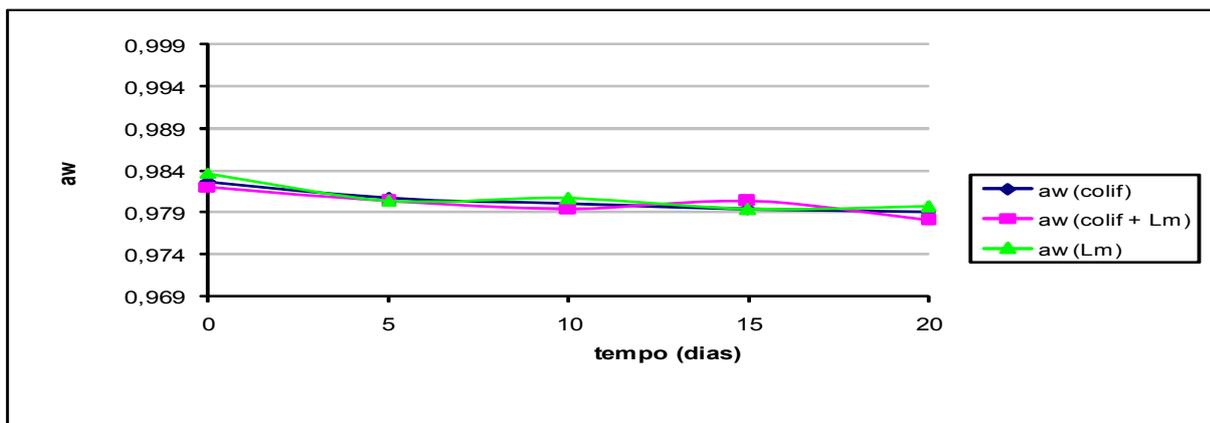


Figura 4. Valores de atividade de água em queijos Minas Frescal produzidos com população baixa de *L. monocytogenes* e fermento láctico, armazenados a 5°C. Cada ponto representa a média de duas amostras de queijo examinadas para cada uma das três repetições de produção. a_w = atividade de água.

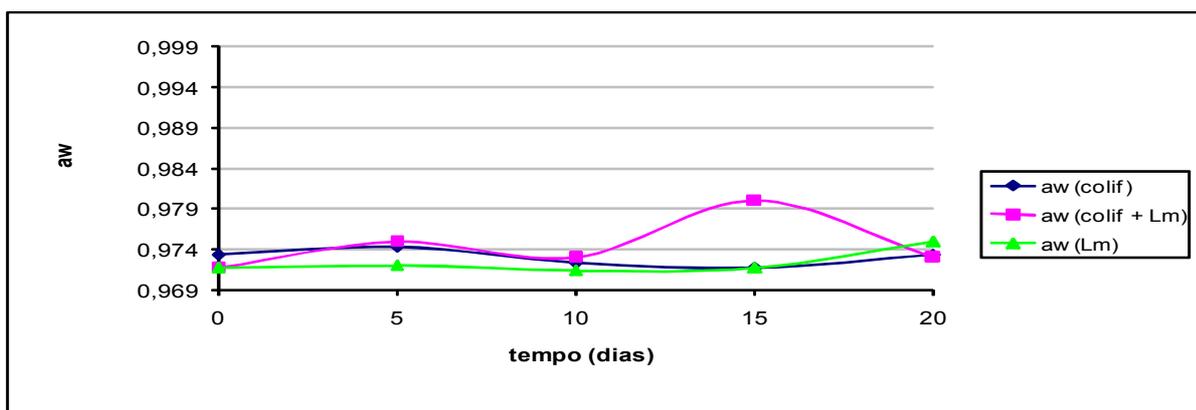


Figura 5. Valores de atividade de água em queijos Minas Frescal produzidos com população alta de *L. monocytogenes* e ácido láctico, armazenados a 5°C/16h e 25°C/8h. Cada ponto representa a média de duas amostras de queijo examinadas para cada uma das três repetições de produção. a_w = atividade de água.

BURITI et al. (2005a) produziram queijos Minas Frescal com adição de ácido láctico e fermento láctico e observaram uma pequena queda nos valores de atividade de água, durante os 21 dias de armazenamento a 5°C. O mesmo foi observado neste trabalho.

Segundo FOX (2000), a queda nos valores de a_w pode ocorrer pela perda de água por evaporação, salga e pela hidrólise das proteínas a peptídeos e aminoácidos e de triglicerídeos a glicerol e ácidos graxos. Isto também pode ter ocorrido com os queijos deste estudo.

Na tabela 3 encontram-se as médias dos valores iniciais e finais de a_w de cada tipo de queijo, em cada produção. Em 50% dos queijos os valores de a_w foram significativamente diferentes ($p < 0,05$) quando comparados os tipos de acidificação empregados (Tabela 4).

Tabela 3. Valores médios iniciais e finais de atividade de água nos queijos.

Inóculo de Lm	Tipo de acidificação ¹	Temperatura de armazenamento	Tipo de queijo ²	Valor médio inicial ³	Valor médio final ³
alto	AL	5°C	C	0,983	0,978
			L	0,986	0,979
			LC	0,986	0,979
baixo	AL	5°C	C	0,984	0,975
			L	0,985	0,977
			LC	0,985	0,977
alto	AL	12°C	C	0,981	0,971
			L	0,984	0,972
			LC	0,981	0,973
baixo	AL	12°C	C	0,985	0,982
			L	0,987	0,979
			LC	0,985	0,980
alto	AL	5°C/16h e 25°C/8h	C	0,973	0,973
			L	0,972	0,975
			LC	0,972	0,973
baixo	AL	5°C/16h e 25°C/8h	C	0,987	0,976
			L	0,987	0,976
			LC	0,985	0,977
alto	FL	5°C	C	0,983	0,979
			L	0,983	0,977
			LC	0,986	0,977
baixo	FL	5°C	C	0,987	0,979
			L	0,984	0,980
			LC	0,986	0,979
alto	FL	12°C	C	0,987	0,979
			L	0,984	0,979
			LC	0,984	0,979
baixo	FL	12°C	C	0,983	0,979
			L	0,984	0,980
			LC	0,982	0,978
alto	FL	5°C/16h e 25°C/8h	C	0,987	0,979
			L	0,986	0,980
			LC	0,984	0,980
baixo	FL	5°C/16h e 25°C/8h	C	0,987	0,979
			L	0,984	0,978
			LC	0,982	0,980

¹ AL = ácido láctico; FL = fermento láctico.

² C = queijo somente com coliformes; L = queijo somente com *L. monocytogenes*; LC = queijo com coliformes e *L. monocytogenes*.

³ média da duplicata de três repetições.

4.7. Comportamento dos coliformes em queijo Minas Frescal

O comportamento dos coliformes presentes nos queijos foi semelhante em todos os tipos de produção. A população inicial desses microrganismos variou entre $10^6 - 10^7$ UFC/ml de leite e aumentou até $10^8 - 10^9$ UFC/g de queijo, o que pôde ser observado no já 5º dia para queijos armazenados a 5°C e 12°C, e no 2º dia para queijos armazenados com alternância de temperaturas. Essa população manteve-se constante até o final do armazenamento.

Nas figuras 6 e 7 pode-se observar o comportamento dos coliformes durante o tempo de armazenamento.

A diferença entre a população de coliformes no leite (T_0) e no queijo recém preparado (T_1) é decorrente da concentração devida à coagulação e dessoragem.

Diferenças ($p < 0,05$) nas populações de coliformes presentes em queijos C e LC foram significativas apenas em queijos produzidos com inóculo alto de *L. monocytogenes* e ácido láctico e armazenados a 12°C no 10º dia (figura 6b).

Diferenças significativas ($p < 0,05$) também foram encontradas no leite (T_0) com inóculo baixo de *L. monocytogenes* acidificado com fermento láctico, que foi posteriormente armazenado a 5°C (figura 7a) e no leite (T_0) utilizado no preparo de queijos que foram armazenados com alternância de temperaturas (figura 7c).

Nos queijos com inóculo baixo de *L. monocytogenes* e acidificados com ácido láctico, observou-se diferença ($p < 0,05$) no 4º dia de armazenamento com

alternância de temperaturas (figura 7c). Com exceção deste último caso, os queijos contendo as duas bactérias apresentaram populações de coliformes maiores que os queijos que continham coliformes. Esses resultados levaram à realização de um teste para verificar se colônias de *Listeria* poderiam estar sendo consideradas como coliformes, mas isto não ocorreu.

Em alguns dias, quando comparadas as populações de coliformes entre queijos armazenados a 5°C e 12°C, foi verificada diferença significativa ($p < 0,05$). Nesses casos, as populações apresentaram-se maiores quando os queijos foram armazenados em temperatura de abuso, fato este esperado, já que essa temperatura é mais propícia para a multiplicação desses microrganismos.

Diferenças estatísticas significativas ($p < 0,05$) nas populações de coliformes entre queijos produzidos com ácido láctico e fermento láctico foram observadas em alguns dias de análises para alguns queijos. Porém, em termos microbiológicos, na maioria das vezes os valores obtidos foram muito semelhantes entre si. Em vários momentos onde se verificou essa diferença, as populações de coliformes apresentaram-se mais baixas nos queijos acidificados com fermento láctico, indicando que as bactérias lácticas podem ter inibido o aumento desse grupo de microrganismos.

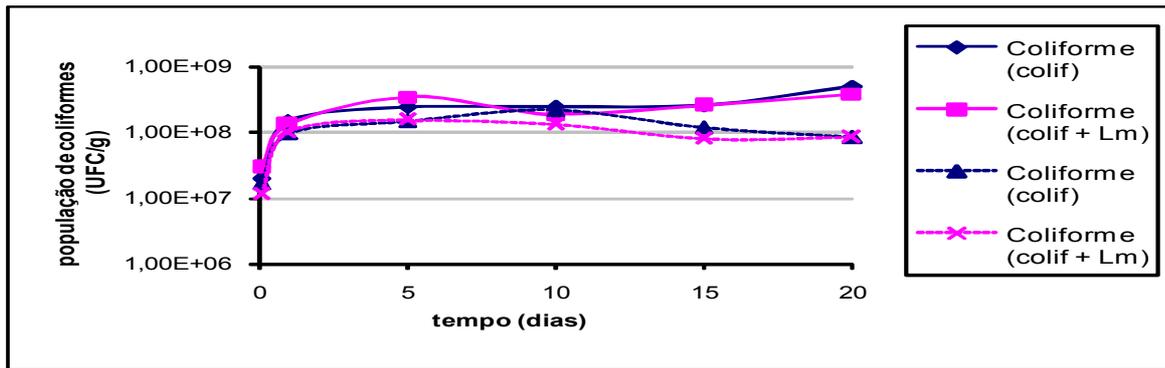
Resultados semelhantes aos nossos foram encontrados por DORNELLAS (1997), que observou que as populações de coliformes totais e fecais em queijo Minas Frescal produzido com cultura láctica apresentaram maior queda durante o armazenamento, quando comparadas com as presentes em queijos

acidificados com ácido láctico. Resultados semelhantes foram também obtidos por LOURENÇO NETO (1998).

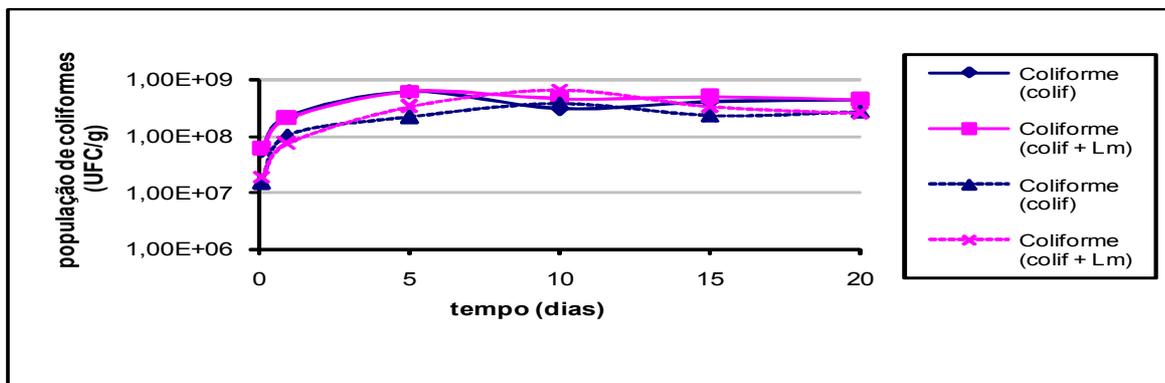
CAMPOS (2000) produziu queijos Minas Frescal acidificados com ácido láctico e com fermento láctico (0,1% e 0,5%). Os resultados obtidos nas análises de coliformes totais e fecais e bolores e leveduras demonstraram que, para todos os microrganismos estudados, as maiores taxas de crescimento foram encontradas em queijos com adição de ácido láctico. Eles concluíram que o uso do fermento láctico na fabricação desse tipo de queijo, mesmo em pequenas proporções, confere ação protetora contra os microrganismos indicadores.

SAAD et al. (2001) produziram queijos Minas Frescal acidificados com ácido láctico e com fermento láctico e contaminados com *E. coli* O157:H7 e relataram que a população do patógeno aumentou, durante as primeiras 24 horas, nos dois tipos de queijo, sendo que o aumento foi maior nos queijos acidificados com ácido láctico (2 log) do que nos queijos em que se utilizou a cultura starter (0,5 log).

(a)



(b)



(c)

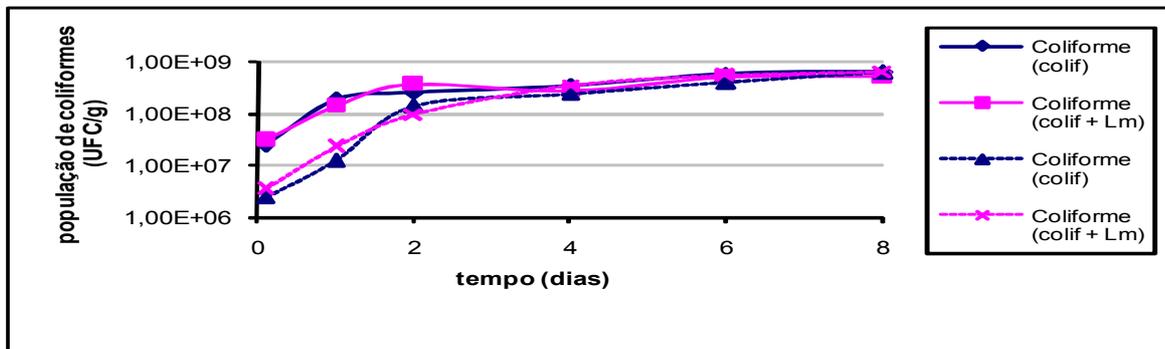
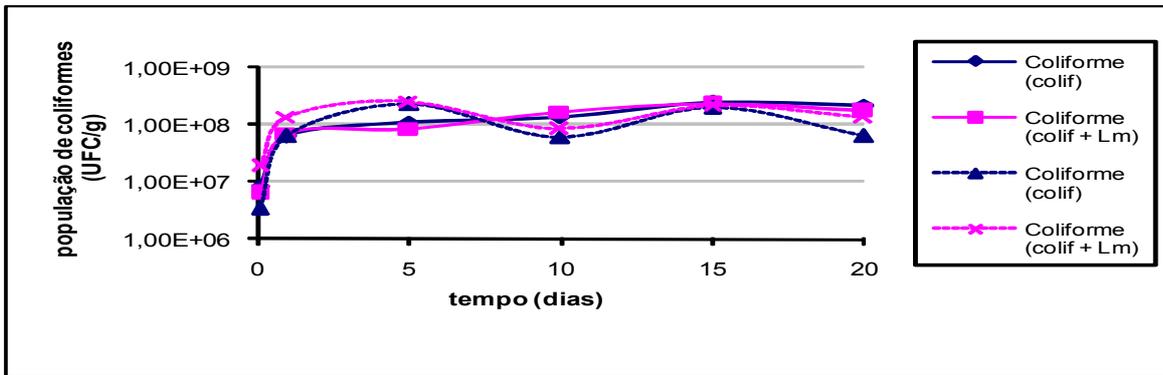
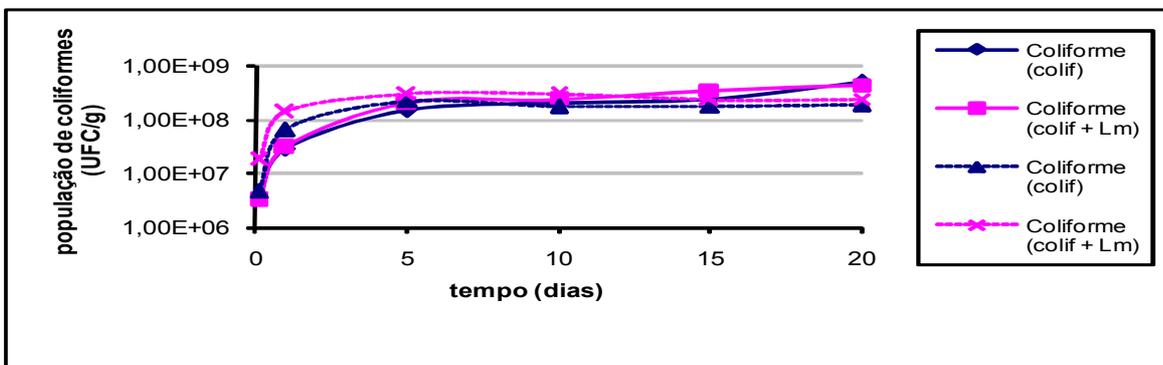


Figura 6. População de coliformes no leite (tempo 0) e em queijos Minas Frescal produzidos com população alta de *L. monocytogenes*, ácido láctico (linhas cheias) e fermento láctico (linhas pontilhadas), armazenados a 5°C (a), 12°C (b) e 5°C/16h e 25°C/8h (c). Cada ponto representa a média de duas amostras de queijo examinadas para cada uma das três repetições de produção. Lm = *Listeria monocytogenes*; colif = coliformes.

(a)



(b)



(c)

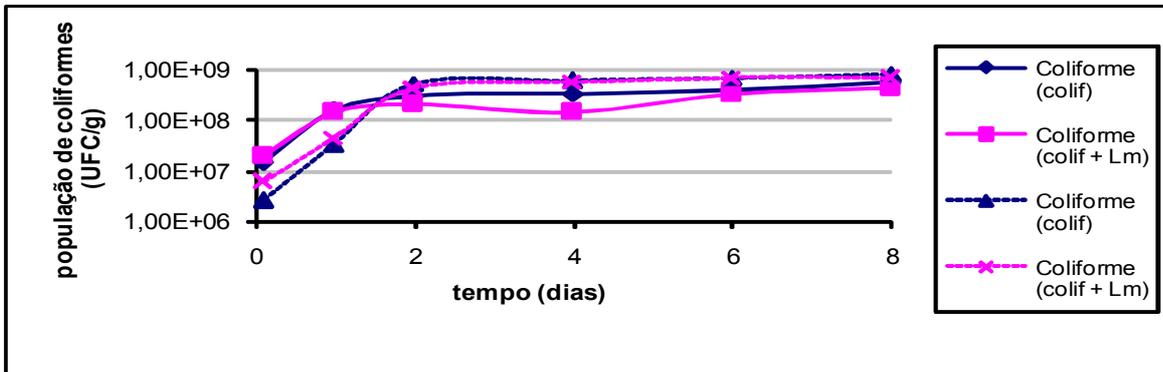


Figura 7. População de coliformes no leite (tempo 0) e em queijos Minas Frescal produzidos com população baixa de *L. monocytogenes*, ácido láctico (linhas cheias) e fermento láctico (linhas pontilhadas), armazenados a 5°C (a), 12°C (b) e 5°C/16h e 25°C/8h (c). Cada ponto representa a média de duas amostras de queijo examinadas para cada uma das três repetições de produção. Lm = *Listeria monocytogenes*; colif = coliformes.

4.8. Comportamento das bactérias lácticas em queijo Minas Frescal

Em todas as produções foi verificado aumento da população de bactérias lácticas durante o período de armazenamento dos queijos, sendo a população inicial ao redor de $10^5 - 10^6$ UFC/mL de leite e final entre $10^8 - 10^9$ UFC/g de queijo. Isso foi verificado tanto em queijos acidificados com ácido láctico como por fermento láctico.

Tal como ocorreu com os coliformes, a diferença entre a população de bactérias lácticas no leite (T_0) e no queijo recém preparado (T_1) é decorrente da concentração para a produção do queijo.

Nas figuras 8 e 9 pode-se observar o comportamento das bactérias lácticas durante o tempo de armazenamento.

Uma observação interessante é que em todas as produções a população inicial de bactérias lácticas nos queijos somente com *L. monocytogenes* foi sempre menor que nos queijos contendo coliformes. Não se encontrou explicação para este fato, uma vez que o leite empregado nos diferentes tipos de formulação era de um mesmo lote, de mesmo fornecedor. A hipótese de que os coliformes poderiam estar sendo enumerados como bactérias lácticas, no ágar MRS, foi descartada após teste de semeadura da cultura de coliformes nesse ágar.

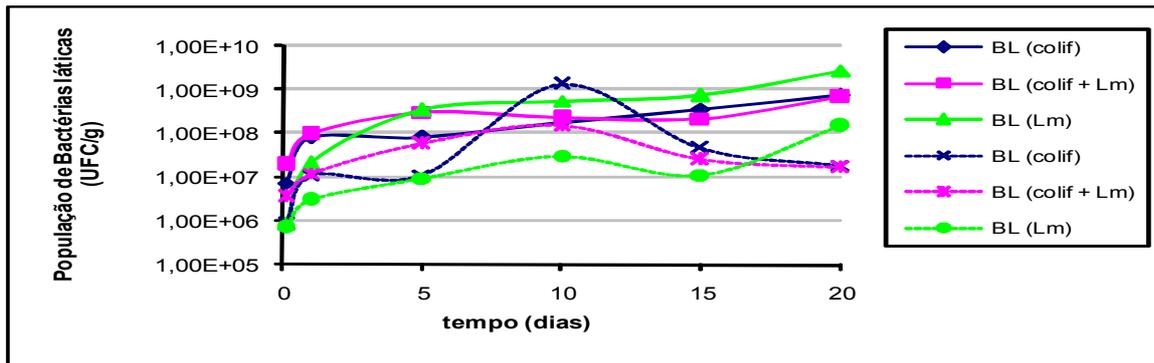
A diferença entre as populações de bactérias lácticas nas diferentes temperaturas de armazenamento foi pequena. Nos queijos armazenados a 5°C e contaminados somente com *Listeria monocytogenes* (figuras 8a e 9a) houve

um incremento maior na população de bactérias láticas ao longo do tempo, sendo esse aumento de 2 a 3 log. Uma hipótese é que os coliformes tenham inibido a multiplicação dessas bactérias nos outros queijos, porém isso não pode ser afirmado, uma vez que isso não foi avaliado.

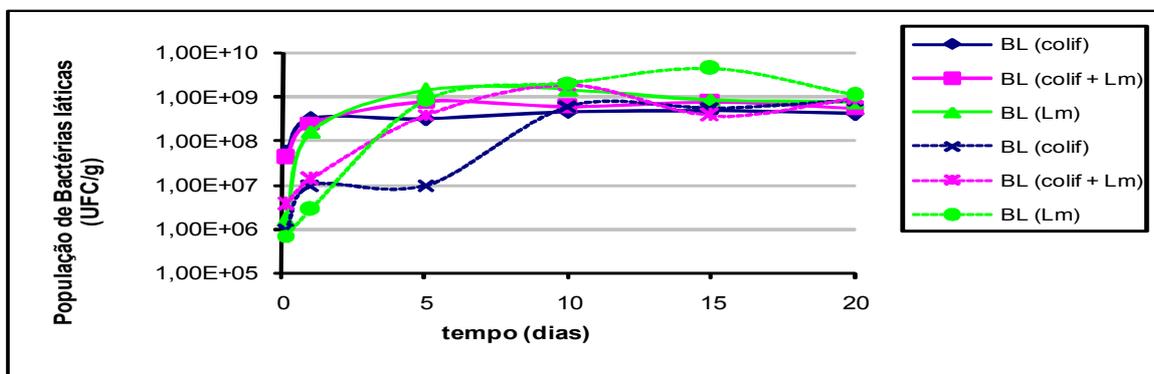
Concordando com os dados obtidos neste trabalho, Alegro (2003) produziu queijo tipo Minas com adição de ácido lático e verificou um aumento na população de bactérias láticas durante os 21 dias de armazenamento a 5°C. O autor relata que isso se deve ao binômio tempo x temperatura do processo de fabricação do queijo, que possibilita o aumento da população dessas bactérias nesse alimento tão rico em nutrientes.

Conforme pode ser verificado nas figuras 8 e 9, em vários dias de análise, a população de bactérias láticas apresentou-se maior nos queijos produzidos com ácido lático do que com fermento lático. Este fato não era esperado e está em desacordo com o verificado por BURITI et al. (2005b) e por NALDINI (2002). Os primeiros verificaram maiores populações de bactérias láticas (8 – 9 log UFC/g) em queijos adicionados da cultura lática e menores (6 – 7 log UFC/g), quando acidificados com ácido lático. NALDINI (2002) também avaliou população de bactérias láticas em queijos Minas Frescal produzidos com ácido lático e fermento lático.

(a)



(b)



(c)

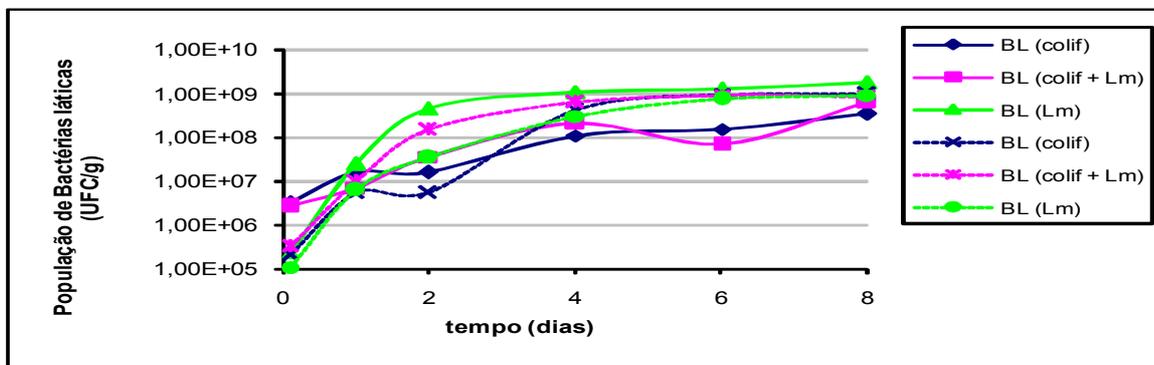
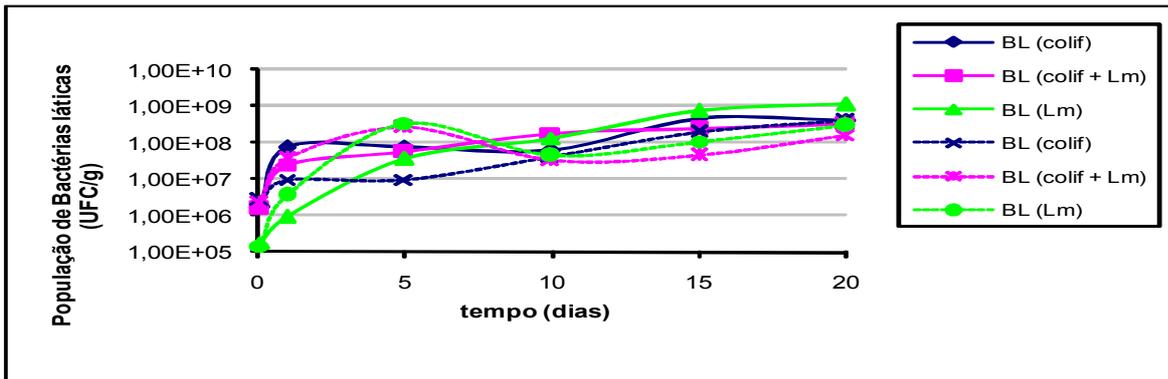
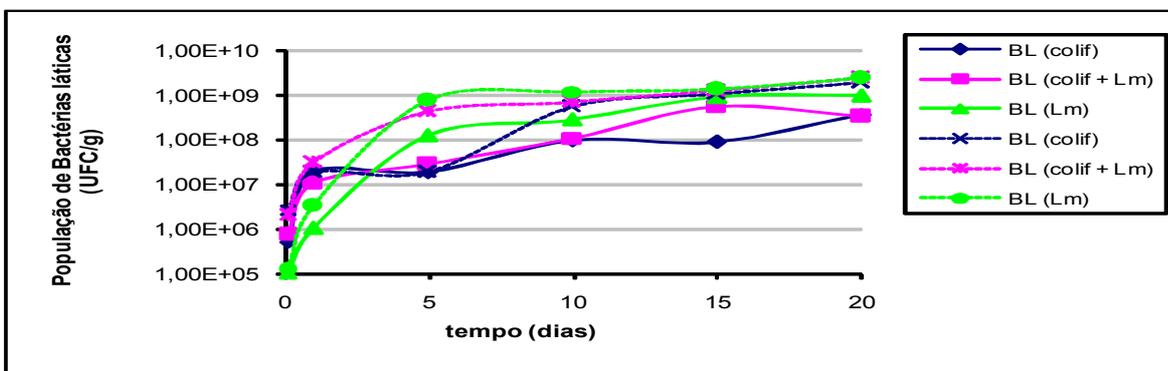


Figura 8. População de bactérias lácticas (BL) no leite (tempo 0) e em queijos Minas Frescal produzidos com população alta de *L. monocytogenes*, ácido láctico (linhas cheias) e fermento láctico (linhas pontilhadas), armazenados a 5°C (a), 12°C (b) e 5°C/16h e 25°C/8h (c). Cada ponto representa a média de duas amostras de queijo examinadas para cada uma das três repetições de produção. Lm = *Listeria monocytogenes*; colif = coliformes; BL = bactérias lácticas.

(a)



(b)



(c)

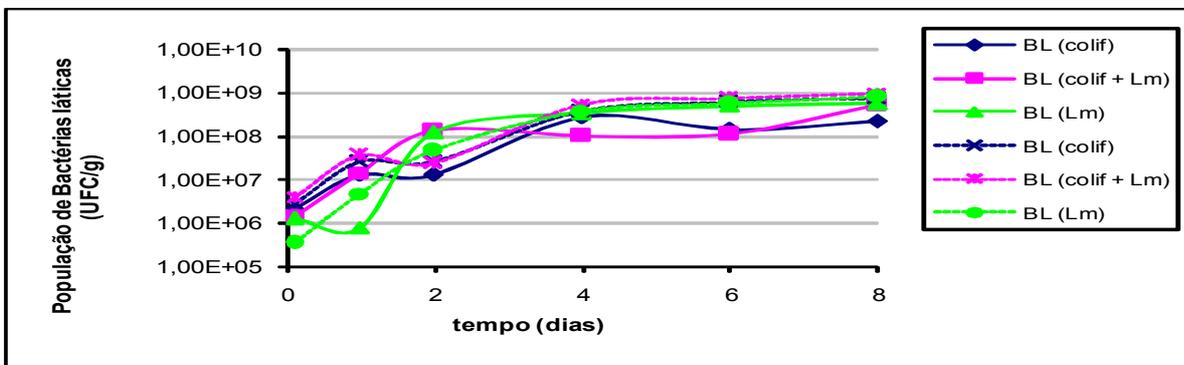


Figura 9. População de bactérias lácticas (BL) no leite (tempo 0) e em queijos Minas Frescal produzidos com população baixa de *L. monocytogenes*, ácido láctico (linhas cheias) e fermento láctico (linhas pontilhadas), armazenados a 5°C (a), 12°C (b) e 5°C/16h e 25°C/8h (c). Cada ponto representa a média de duas amostras de queijo examinadas para cada uma das três repetições de produção. Lm = *Listeria monocytogenes*; colif = coliformes; BL = bactérias lácticas.

4.9. Comportamento de *Listeria monocytogenes* em queijo Minas Frescal

Pôde-se observar aumento na população de *L. monocytogenes* durante o tempo de armazenamento em todos os queijos. Visando uma melhor visualização desse comportamento, gráficos com o incremento das populações foram construídos e podem ser observados nas figuras 10 e 12.

Na figura 10a tem-se o incremento da população de *L. monocytogenes* nos queijos produzidos com população alta do patógeno (10^7 UFC/mL), e armazenados a 5°C. Observa-se que os queijos contendo somente Lm apresentaram um maior incremento (aproximadamente 3 log) na população deste microrganismo quando comparados aos queijos contendo Lm e coliformes (aumento de aproximadamente 1 log para queijos acidificados com fermento láctico e 2 log, com ácido láctico). Nesta figura, ainda observa-se que nos queijos produzidos com ácido láctico a população de Lm foi maior que nos produzidos com fermento láctico, indicando que também há inibição do patógeno pelas bactérias lácticas presentes no fermento, quando os queijos são armazenados a 5°C. Essa diferença é estatisticamente significativa ($p < 0,05$) durante todo o tempo de armazenamento.

Segundo SHAH (2000), além de exercerem influência considerável sobre as características físico-químicas e sensoriais dos queijos, muitas bactérias lácticas podem ser úteis por possuírem atividade inibitória através da criação de um ambiente hostil para os microrganismos patogênicos e deteriorantes presentes. ALEXANDRE et al. (2002) isolaram 192 cepas de bactérias lácticas de cinco amostras de queijo tipo Minas em Minas Gerais, Brasil. Os autores

verificaram que 29 cepas (15,1%) foram capazes de inibir *L. monocytogenes* Scott A, utilizando teste de inibição direta, *in vitro*.

NALDINI (2002) produziu queijos Minas Frescal acidificados com ácido láctico e cultura láctica, contaminados com Lm e armazenados a 5°C. O autor verificou que a população de Lm aumentou 0,5 log nos queijos produzidos com o fermento láctico e 2,5 log naqueles com o ácido láctico. Quando a temperatura de armazenamento foi de 10°C, a população de Lm manteve-se constante no queijo acidificado com fermento láctico e aumentou 2 log nos queijos com ácido láctico.

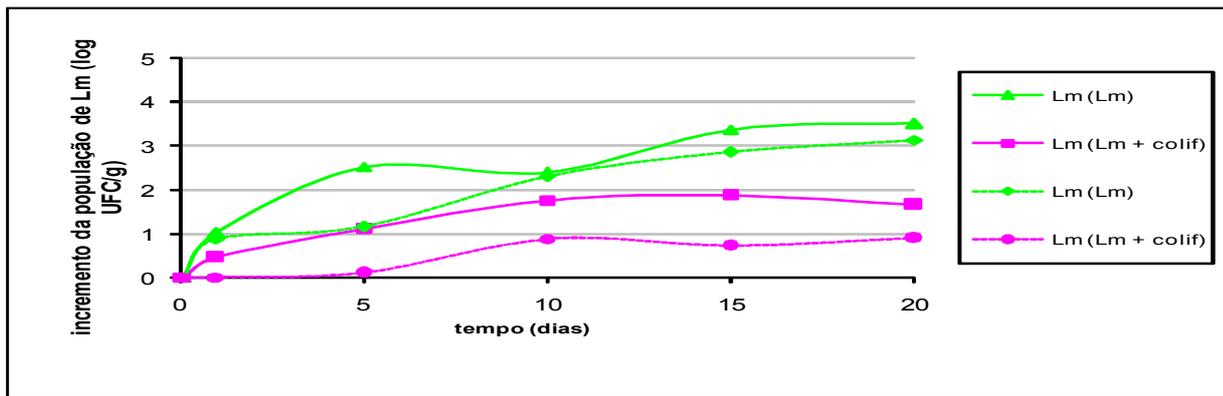
Nos queijos armazenados a 12°C, adicionados também de população alta de Lm (figura 10b), o comportamento do patógeno foi semelhante ao descrito anteriormente. Neste caso, queijos contendo somente Lm também apresentaram um maior incremento na população deste microrganismo (aproximadamente 2,5 log de aumento em queijos produzidos com ácido láctico e 2 log de aumento em queijos produzidos com fermento láctico) quando comparados aos queijos contendo Lm e coliformes (aumento de aproximadamente 1 log para queijos acidificados com fermento láctico e 0,5 log, com ácido láctico). Observa-se ainda que queijos preparados somente com Lm apresentaram incremento maior da população do patógeno quando acidificados com ácido láctico. Essa inibição pode ser resultante da produção, pelo fermento, de conservantes naturais, como ácidos orgânicos, peróxido de hidrogênio e diacetil ou de antimicrobianos, ou também devido à competição (GHRAIRI et al., 2004; HERREROS et al., 2005; TOMÉ et al., 2006). O comportamento inverso foi observado nos queijos produzidos com Lm e

coliformes, onde o incremento na população de Lm foi maior quando se utilizou fermento láctico. Isto ficou evidente a partir do 10º dia de armazenamento (figura 10b).

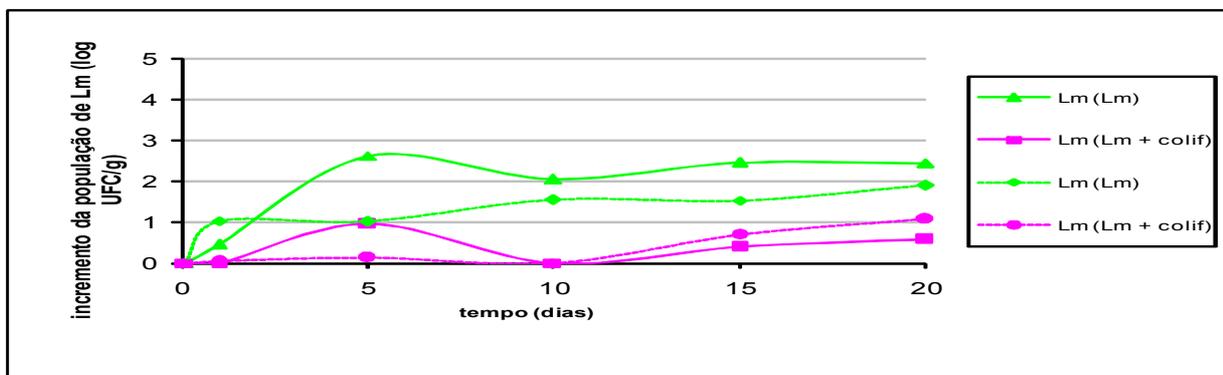
Queijos contendo alta população de *Listeria* e armazenados a 5°C apresentaram população final maior (aproximadamente 1 log) do patógeno quando comparados com queijos armazenados a 12°C. Resultados inversos aos nossos foram verificados por NALDINI (2002). Esta diferença pode ser decorrente de características intrínsecas das cepas de Lm que foram utilizadas.

Nos queijos com alta população de Lm e armazenados com alternância de temperaturas (figura 10c) verificou-se maior incremento na população do patógeno nos produzidos somente com Lm quando comparados com queijos produzidos com Lm e coliformes. Porém, nesse tipo de armazenamento verificou-se que os queijos produzidos com fermento láctico apresentaram maior incremento na população de Lm que os produzidos com ácido láctico.

(a)



(b)



(c)

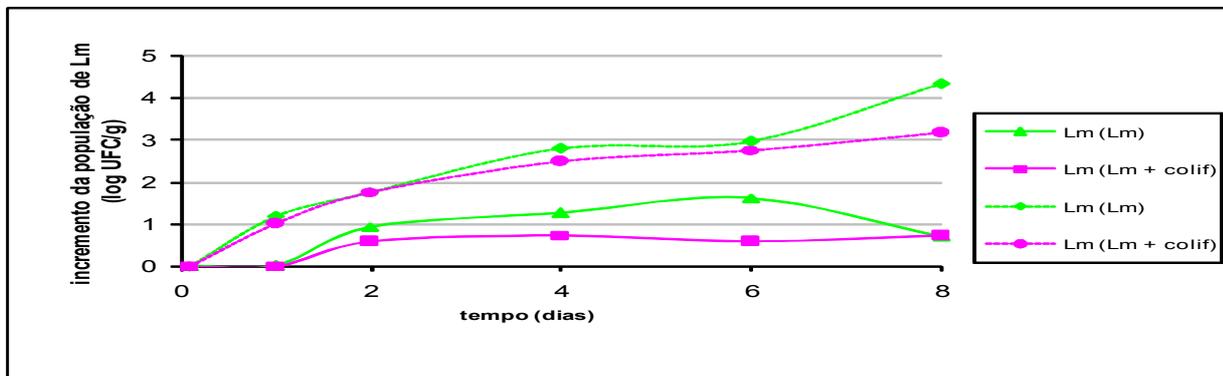


Figura 10. Incremento na população de *L. monocytogenes* (Lm) no leite (tempo 0) e em queijos Minas Frescal produzidos com população alta do patógeno e ácido láctico (linhas cheias) ou fermento láctico (linhas pontilhadas), armazenados a 5°C (a), 12°C (b) e 5°C/16h e 25°C/8h (c). Cada ponto representa a média de duas amostras de queijo examinadas para cada uma das três repetições de produção. Lm = *Listeria monocytogenes*; colif = coliformes.

A população de Lm foi sempre maior nos leites co-inoculados com coliformes, quando comparada àqueles inoculados somente com o patógeno.

Porém, essa diferença foi observada somente nos leite e não nos queijos (figura 11). Variação na população de Lm nas alíquotas utilizadas não pode ser usada para explicar esse fato, pois todas provinham de um mesmo caldo de cultivo e eram mantidas congeladas a -70°C . Testes foram realizados para se verificar se os coliformes poderiam estar sendo enumerados como *Listeria* no ágar Oxford, mas a hipótese foi descartada pois estes não se desenvolveram no meio.

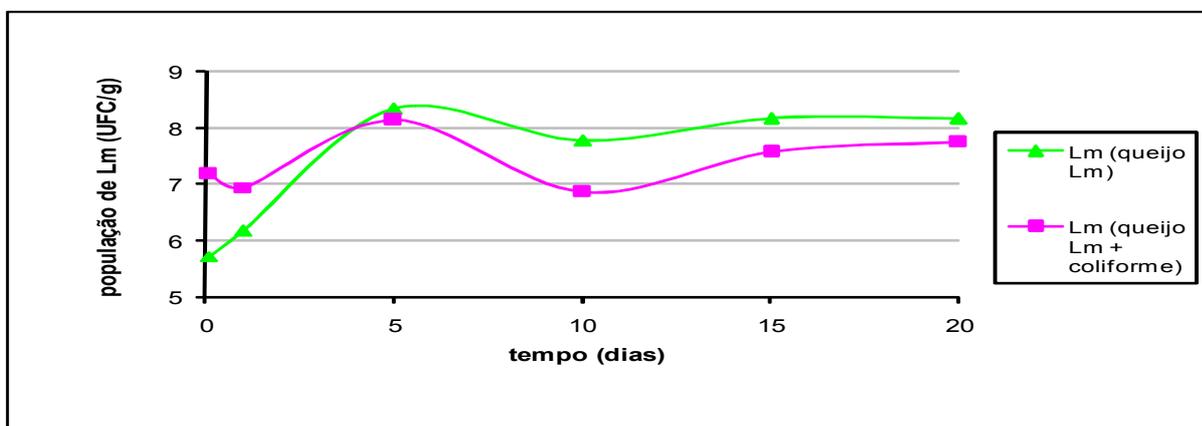


Figura 11. População de *L. monocytogenes* (Lm) no leite (tempo 0) e em queijos Minas Frescal produzidos com população alta do patógeno e ácido láctico, armazenados a 12°C . Cada ponto representa a média de duas amostras de queijo examinadas para cada uma das três repetições de produção. Lm = *Listeria monocytogenes*.

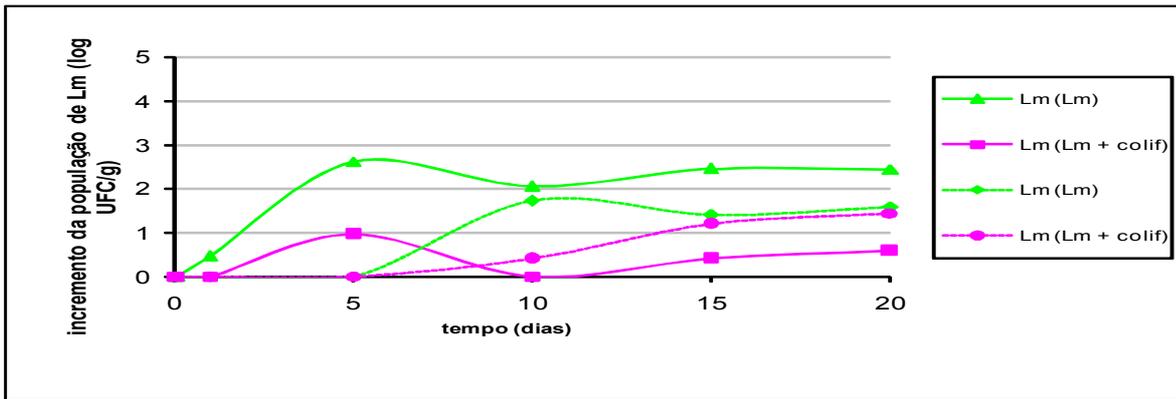
Na figura 12 pode-se observar o incremento na população de Lm nos queijos adicionados de baixa população (1UFC/mL) do patógeno. Nos queijos armazenados a 5°C (figura 12a) e a 12°C (figura 12b) contendo somente Lm verificou-se maior incremento na população do patógeno quando comparados com queijos contendo Lm e coliformes.

Comportamento diferente foi verificado nos queijos armazenados com alternância de temperaturas (figura 12c). Verificou-se incremento semelhante

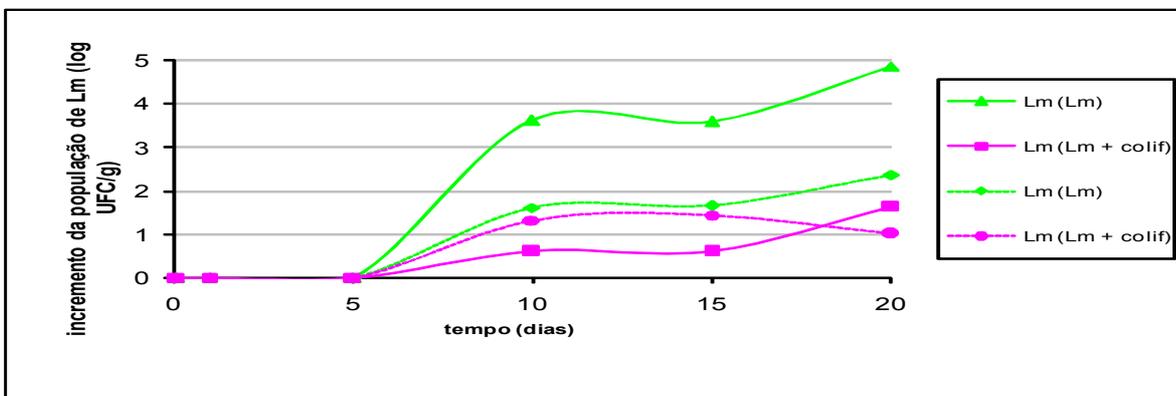
da população de Lm em queijos produzidos com ácido láctico contendo somente Lm e contendo Lm e coliformes a partir do 6º dia de armazenamento.

Segundo MENA et al. (2004), dados preditivos obtidos com a utilização do software Food MicroModel (Leatherhead Food International, Surrey, UK) indicam que após 5 dias de armazenamento a 5°C, a população final de *L. monocytogenes* em um queijo fresco com população inicial de 10 células/g pode ser de 10³UFC/g. Essa concentração final poderia ainda aumentar para 10⁷UFC/g se a temperatura de armazenamento fosse 10°C. Em nosso estudo verificou-se um incremento de aproximadamente 2,5 log na população de Lm nos queijos contaminados somente com 1 UFC/g de Lm, acidificados com ácido láctico e armazenados a 5°C. Discordando desse modelo proposto por MENA et al. (2004), quando os queijos deste estudo, que continham 1UFC/g de Lm, acidificados com ácido láctico foram armazenados a 12°C não houve incremento da população em 5 dias de armazenamento.

(a)



(b)



(c)

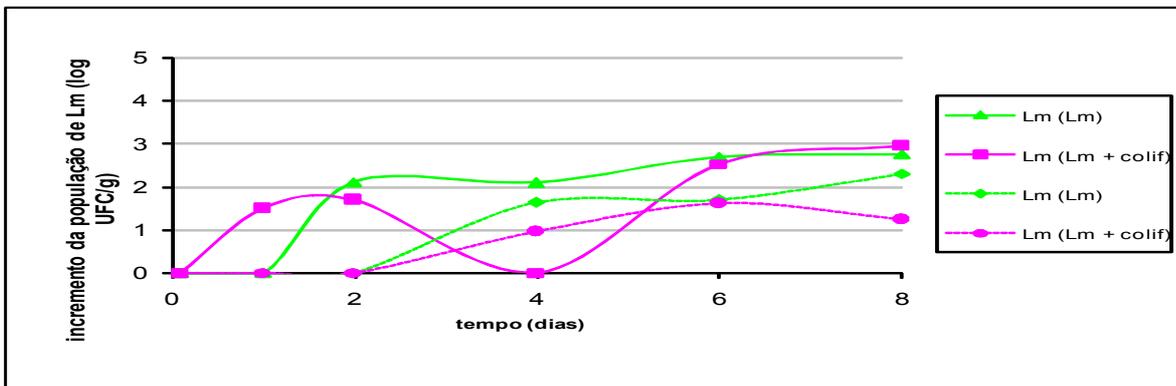


Figura 12. Incremento na população de *L. monocytogenes* (Lm) no leite (tempo 0) e em queijos Minas Frescal produzidos com população baixa do patógeno e ácido láctico (linhas cheias) ou fermento láctico (linhas pontilhadas), armazenados a 5°C (a), 12°C (b) e 5°C/16h e 25°C/8h (c). Cada ponto representa a média de duas amostras de queijo examinadas para cada uma das três repetições de produção. Lm = *Listeria monocytogenes*; colif = coliformes.

Não foram encontrados na literatura trabalhos relacionando a população de *L. monocytogenes* e outros microrganismos em queijos macios. CARLIN et al. (1996) avaliaram essa relação em endívia minimamente processada, investigando a influência da microbiota natural na população de *Listeria monocytogenes*. Os autores verificaram que há uma competição entre a microbiota da endívia e *L. monocytogenes*, sendo que esta última apresenta incremento maior quando sozinha.

A interferência de coliformes no isolamento de *Listeria* sp foi verificada por SCHITTLER et al. (2002). Os autores inocularam populações de 10^2 UFC/g de *Listeria* sp e de coliformes em pedaços de 250g de queijo tipo prato e analisaram as amostras a cada 3 horas, até 24 horas. Eles verificaram que a população de coliformes apresentou aumento de 5 log durante todo o tempo; *Listeria* sp não foi detectada com semeadura direta em ágar Oxford, mas sempre se desenvolveu quando a amostra foi submetida a enriquecimento. Os autores relatam que os coliformes não influenciaram o desenvolvimento de *Listeria* sp, apesar do contínuo crescimento. Como não foi realizada enumeração do patógeno, não se sabe se sua população aumentou, diminuiu ou manteve-se constante.

Como a cultura de coliformes utilizada neste trabalho é composta basicamente por *E. coli*, pode ser que esteja ocorrendo a produção de ácido por parte dessa bactéria, responsável por essa tendência de diminuição da taxa de crescimento de *L. monocytogenes*. Segundo MALAKAR et al. (2003), a produção de ácidos orgânicos por microrganismos é responsável pela

diminuição do pH e aumento da acidez do alimento, o que pode provocar interação entre os microrganismos presentes.

Em alguns queijos (figuras 10b e 12a, por exemplo), a população de Lm não aumentou no período de 5 para 10 dias, mas pode-se observar aumento a partir desta data. Sabe-se que Lm tem capacidade de produzir proteínas de choque quando exposta a condições sub-letais de pH. Isto pode ter ocorrido com as Lm deste experimento, que após adaptação inicial ao pH ácido puderam se multiplicar. Segundo FALEIRO et al. (2003), a tolerância ao ácido adquirida por Lm é uma das características que pode explicar sua presença em alimentos com pH baixo, como queijos. Os autores explicam que, como esse tipo de alimento apresenta valores de pH usualmente entre 5,0 e 5,5, essa resistência pode ser induzida, o que não ocorre em alimentos com valores letais de pH.

4.10. Monitoramento da acidez titulável e do pH

Segundo JAY (2000), na determinação da concentração de ácidos orgânicos em alimentos, a medida da acidez titulável é mais expressiva que a do pH isolado, uma vez que a medição do pH é dada pela concentração de íons hidrogênio e os ácidos orgânicos podem não estar completamente dissociados. Segundo o mesmo autor, a acidez titulável é o melhor indicador da acidez presente em alguns alimentos.

A acidez foi avaliada em queijos sem contaminação e contaminados somente com coliformes, acidificados com ácido láctico e com fermento láctico e armazenados a 5°C, 12°C e com alternância de temperaturas. Os resultados obtidos estão apresentados nas figuras 13 (para queijos armazenados nas duas primeiras temperaturas) e 15 (para queijos armazenados com alternância de temperaturas). Nas figuras 14 e 16, para fins de comparações, são mostrados os valores de pH mensurados nesses mesmos queijos.

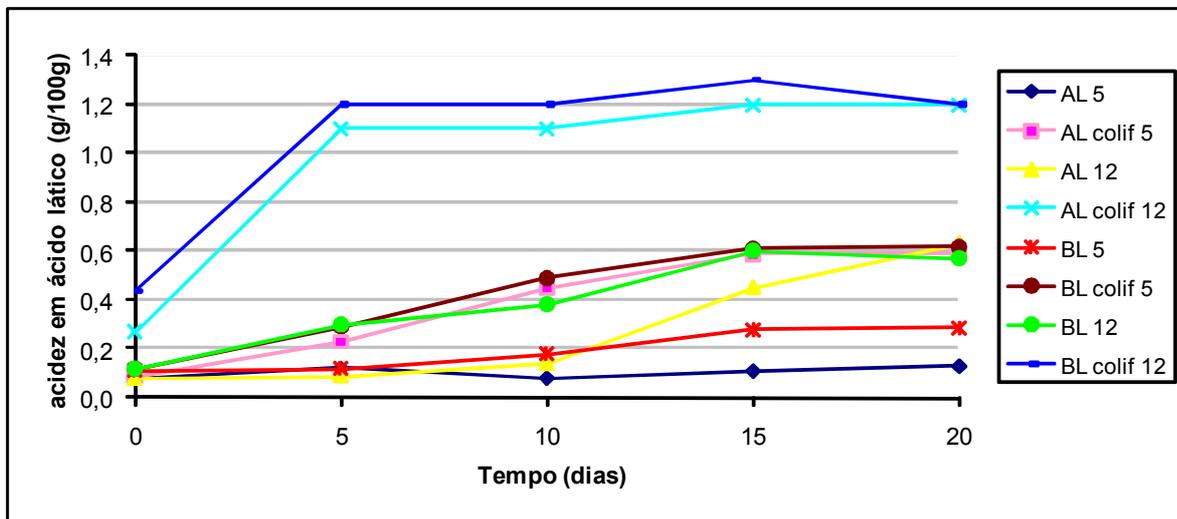


Figura 13. Valores de acidez titulável obtidos para os queijos armazenados a 5°C e 12°C. AL = acidificação com ácido láctico; BL = acidificação com fermento láctico; colif = queijo com coliformes; 5 e 12 = temperaturas de armazenamento dos queijos.

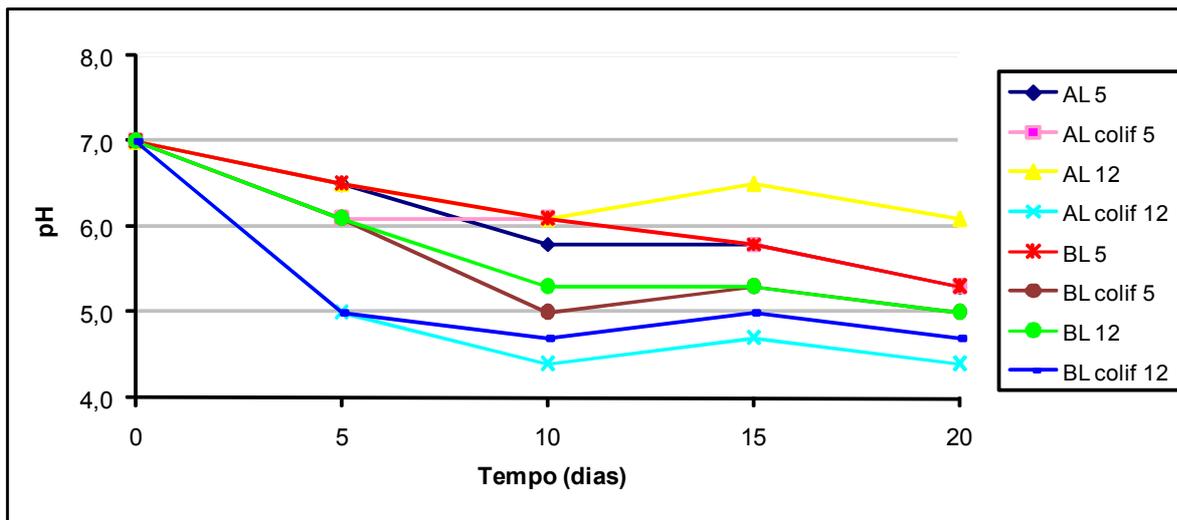


Figura 14. Valores de pH obtidos para os queijos armazenados a 5°C e 12°C. AL = acidificação com ácido lático; BL = acidificação com fermento lático; colif = queijo com coliformes; 5 e 12 = temperaturas de armazenamento dos queijos.

Nas figuras 13 e 14 pode-se observar que os queijos produzidos com ácido lático ou bactérias lácticas, contaminados com coliformes e armazenados a 12°C foram os que apresentaram maior acidez e menores valores de pH. Essa correlação aconteceu em todos os tipos de queijos, com exceção do queijo sem contaminação, produzido com ácido lático e armazenado a 12°C.

Os queijos menos ácidos foram os sem contaminação (controle) e armazenados a 5°C. A acidez neste tipo de queijo foi de 0,1g/100g no dia da produção e atingiu no máximo 0,3g/100g em 20 dias de armazenamento. Os queijos que continham coliformes apresentaram acidez de 1,2g/100g quando armazenados em temperatura de abuso (12°C) e 0,6g/100g quando armazenados a 5°C. Esses resultados comprovam a produção de ácido lático pelos coliformes, sendo esse ácido o suposto responsável pela inibição de *Listeria* nos queijos.

A importância do ácido láctico na multiplicação de *Lm* foi comprovada por CONNER et al. (1990). Eles avaliaram a população de *Lm* em TSB e em TSB acidificado (pH 4,5) durante 12 semanas de armazenamento a 10°C. A população inicial do patógeno de 10^4 UFC/mL teve um incremento de 5 log quando em TSB durante esse tempo. Já *Lm* que foi adicionada ao TSB + ácido láctico teve sua população reduzida, atingindo níveis indetectáveis antes de completar 6 semanas de armazenamento.

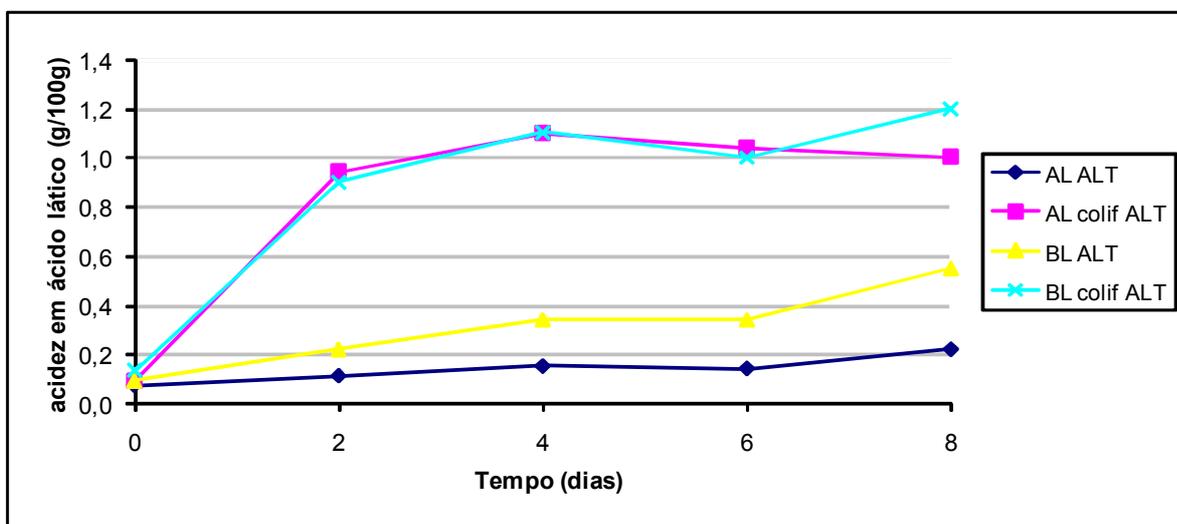


Figura 15. Valores de acidez titulável obtidos para os queijos armazenados com alternância de temperaturas. AL = acidificação com ácido láctico; BL = acidificação com fermento láctico; colif = queijo com coliformes; 5 e 12 = temperaturas de armazenamento dos queijos.

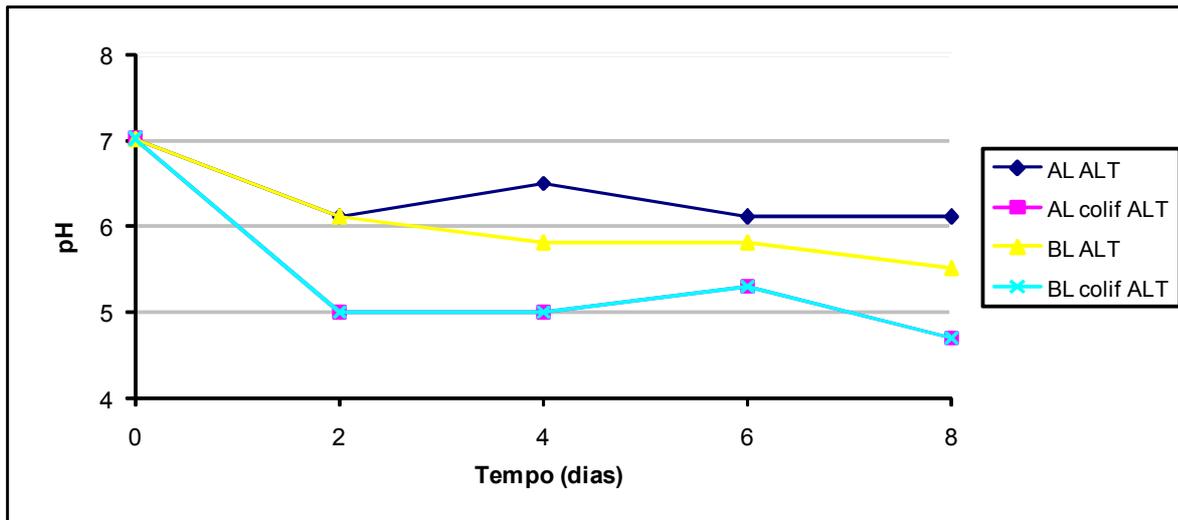


Figura 16. Valores de pH obtidos para os queijos armazenados com alternância de temperaturas. AL = acidificação com ácido lático; BL = acidificação com fermento lático; colif = queijo com coliformes; 5 e 12 = temperaturas de armazenamento dos queijos.

Quando armazenados com alternância de temperaturas, a correlação entre pH e acidez foi verdadeira para todos os queijos. Queijos contaminados com coliformes apresentaram acidez maior e pH menor quando comparados com queijos controle, o que já era esperado.

4.11. Monitoramento da concentração de sal nos queijos

Na figura 17 podem-se observar os valores obtidos na determinação de cloreto de sódio nos queijos. Essa análise foi realizada somente uma vez para cada queijo, no último dia de armazenamento, uma vez que a quantidade tende a ser constante durante o tempo.

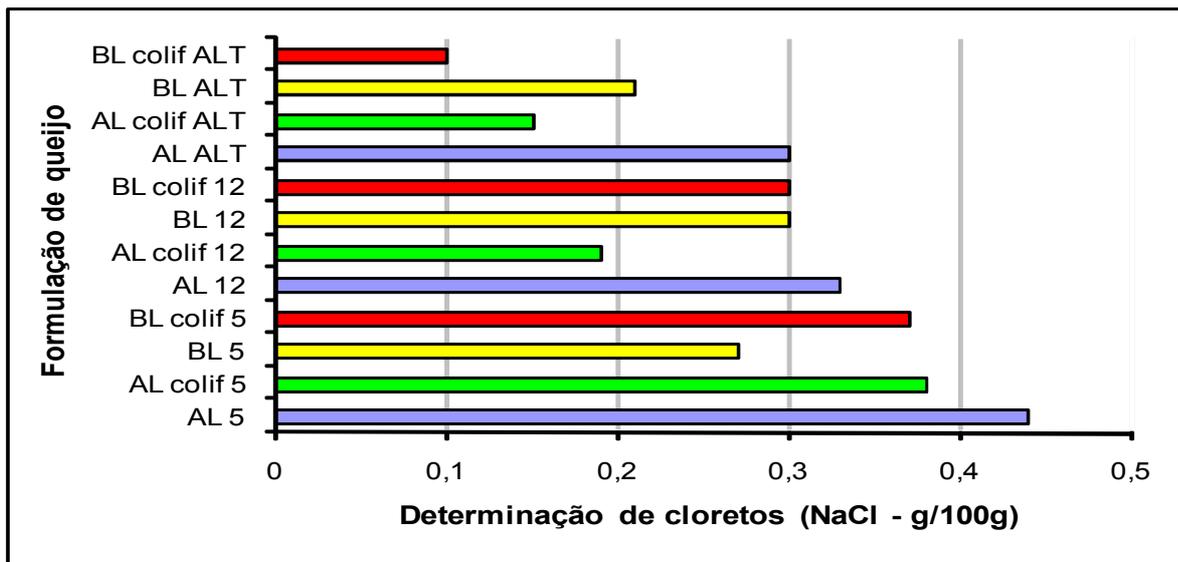


Figura 17. Determinação de cloreto de sódio nos queijos armazenados a 5°C, 12°C e com alternância de temperaturas. AL = acidificação com ácido láctico; BL = acidificação com fermento láctico; colif = queijo com coliformes; 5 e 12 = temperaturas de armazenamento dos queijos.

Os queijos armazenados com alternância de temperaturas foram os que apresentaram menores concentrações de sal, enquanto que os armazenados a 5°C apresentaram os maiores valores. Segundo FOX et al. (1990), o sal apresenta importantes funções nos queijos, como modificar o flavour, reduzir a atividade de água e inibir o crescimento de bactérias indesejáveis. No queijo Minas Frescal, a quantidade de sal é pequena e não inibe *Lm*, uma vez que ela também apresenta capacidade de sobreviver e se multiplicar em quantidades mais elevadas de sal (até 10%) (PATCHETT et al., 1992).

Em quase todos os casos, os queijos contaminados com coliformes apresentaram concentrações de sal menores que os queijos produzidos e armazenados da mesma maneira, mas sem contaminação.

4.12. Avaliação, em ágar, da sensibilidade de *L. monocytogenes* aos coliformes, bactérias lácticas ou a compostos produzidos por eles

Para se comprovar a inibição, observada nos queijos, de Lm pelos coliformes e bactérias lácticas foram realizados testes em meio de cultura. Quando se utilizou o teste de difusão em poços, descrito por DORMAN & DEANS (2000), e o teste de antagonismo simultâneo, descrito por TAGG & McGIVEN (1971), não foi verificado halo de inibição de *L. monocytogenes* pelos coliformes, pelas bactérias lácticas ou por compostos que eles possam ter produzido.

Com a utilização do método da gota (FARIAS et al., 1994), pôde-se observar inibição. Os valores das larguras dos halos de inibição observados encontram-se na tabela 5.

Tabela 5. Valores das larguras de halos de inibição observados utilizando-se o método da gota (FARIAS et al., 1994).

Microrganismo indicador (Lm)	Inibidor	Largura do halo de inibição (mm)
7	BL	1,2
15 E	BL	1,2
30	BL	1,2
pool	BL	1,1
7	Coliforme	-
15 E	Coliforme	1,6
30	Coliforme	1,5
pool	Coliforme	1,6
7	comp. BL	1,2
15 E	comp. BL	1,3
30	comp. BL	1,3
pool	comp. BL	1,2
7	comp. Coliforme	-
15 E	comp. Coliforme	1,6
30	comp. Coliforme	1,6
pool	comp. Coliforme	1,6

Pool = mistura das cepas 07, 15E e 30; BL = bactérias lácticas; comp. BL = compostos produzidos pelas bactérias lácticas; comp. Coliforme = compostos produzidos pelos coliformes.

Como se pode observar na tabela 4, todas as cepas foram inibidas pelas bactérias lácticas ou pelos compostos produzidos por elas. Porém, nos testes com coliformes ou com compostos produzidos por eles, os halos apresentaram larguras um pouco maiores, indicando inibição maior por esse grupo de microrganismos.

A cepa de Lm 07 foi exceção. Foi a única que não foi inibida pelos coliformes. Esta cepa é inibida por algum composto produzido pelas bactérias lácticas, mas não pelos coliformes. Quando testada sua inibição por essas bactérias o resultado foi positivo.

4.13. Avaliação da sensibilidade de *L. monocytogenes* aos coliformes em caldo

A fim de se verificar a inibição de *L. monocytogenes* pelos coliformes foram realizadas curvas de crescimento em TSB, utilizando-se as mesmas culturas de Lm e coliformes empregadas na elaboração dos queijos. Os resultados estão apresentados nas figuras 18 e 19. Na primeira, podem-se observar as populações obtidas quando se utilizaram populações de 10^7 UFC/mL, tanto de coliformes quanto de *Listeria*. Na segunda, a população de coliformes foi a mesma (10^7 UFC/mL), mas a de *Listeria* foi 1 UFC/mL. Os experimentos foram conduzidos simultaneamente, mas os resultados,

apresentados em duas figuras para facilitar a visualização. Por esta razão, as contagens de coliformes são as mesmas nos dois gráficos.

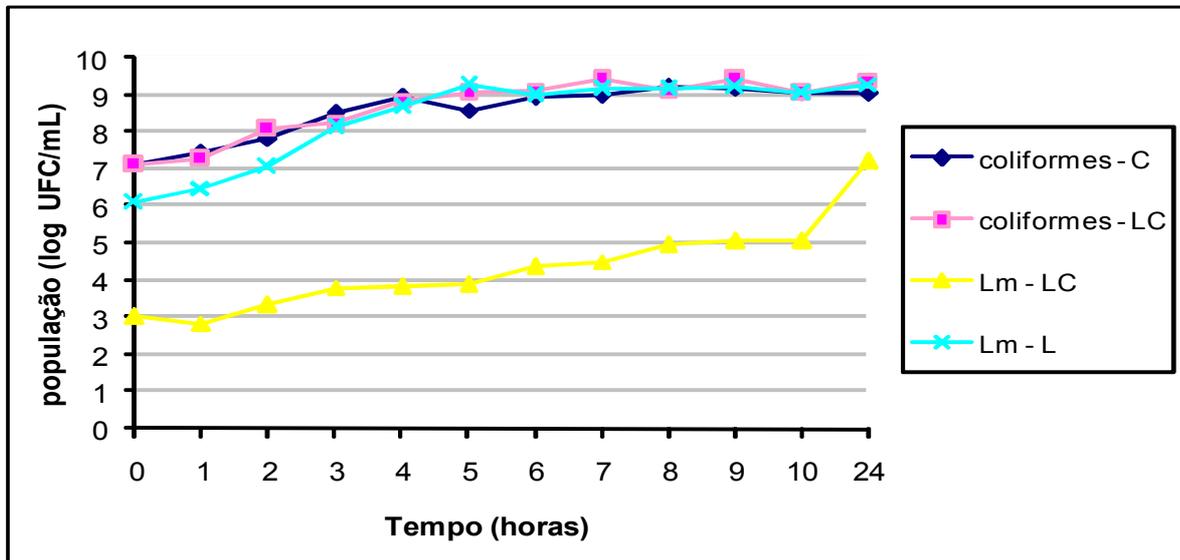


Figura 18. Populações de *Listeria* e coliformes, isolados e em co-cultura, em caldo TSB armazenado a 37°C. Lm = *Listeria monocytogenes*; C = TSB adicionado somente de coliformes; LC = TSB adicionado de coliformes e *L. monocytogenes*; L = TSB adicionado somente de *L. monocytogenes*.

Na figura 18 observa-se que as populações de coliformes mantiveram-se constantes, quando sozinhas ou em co-cultura com *L. monocytogenes*, aumentando 2 log durante o tempo de armazenamento a 37°C.

L. monocytogenes, quando sozinha no TSB, apresentou aumento na população, que inicialmente era de 10^6 UFC/mL e, ao final de 24 horas, foi de 10^9 UFC/mL.

Quando em co-cultura com os coliformes, *L. monocytogenes* apresentou, desde o momento da inoculação, população mais baixa, quando comparada com a observada no caldo contendo somente Lm. Durante as 10 primeiras horas houve um incremento de 2 log na população, sendo que entre

10 e 24 horas houve um aumento adicional de 2 log na população, indicando que pode ter ocorrido desenvolvimento de tolerância ao ácido láctico. Mesmo com todo esse aumento, as populações em caldos que continham somente Lm sempre foram mais altas, comparadas com as dos caldos contendo Lm e coliformes, mostrando, mais uma vez, que esse grupo de microrganismos tem a capacidade de inibir Lm também em meio de cultura.

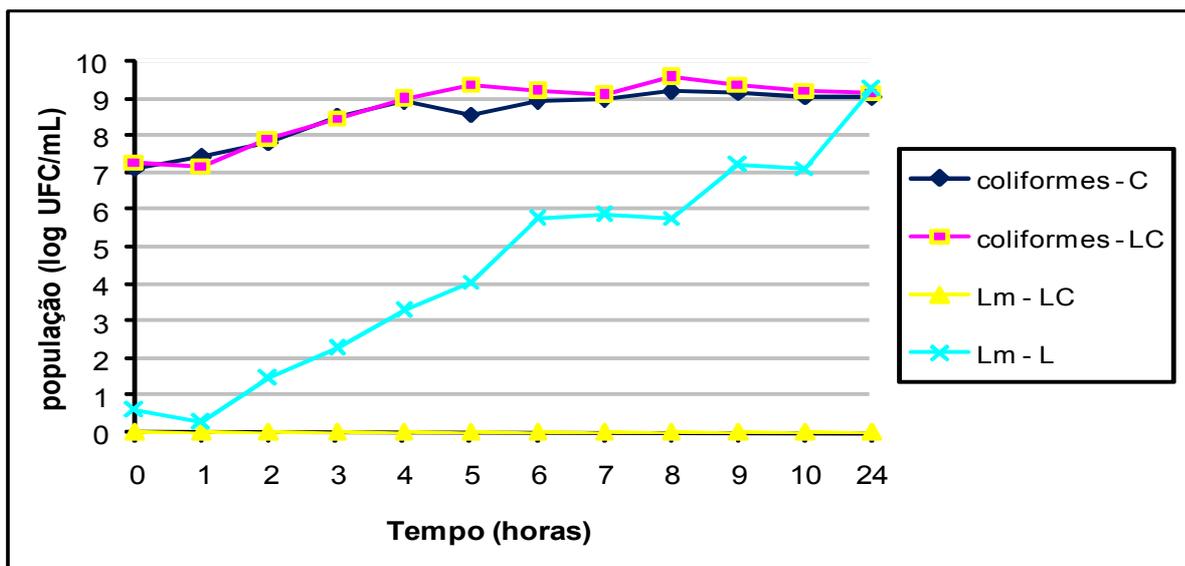


Figura 19. Populações de *Listeria* e coliformes, isolados e em co-cultura, em caldo TSB armazenado a 37°C. Lm = *Listeria monocytogenes*; C = TSB adicionado somente de coliformes; LC = TSB adicionado de coliformes e *L. monocytogenes*; L = TSB adicionado somente de *L. monocytogenes*.

Quando adicionada 1 UFC/mL (figura 19), a população de *L. monocytogenes* aumentou mais de 8 log quando em ausência de coliformes. Quando em co-cultura com os coliformes não foi verificado aumento na população do patógeno. Isso pode indicar que, se presente em baixas concentrações no leite ou nos queijos que contém coliformes, *Listeria monocytogenes* pode não ser isolada do alimento.

4.14. Avaliação da sensibilidade de *L. monocytogenes* ao ácido láctico

Utilizaram-se os valores mais frequentes de acidez encontrados no item 4.10 para se determinar as concentrações de ácido láctico a serem usadas nessas avaliações. Esse teste foi realizado para que se pudesse verificar qual a porcentagem de ácido láctico seria inibitória para a multiplicação de *L. monocytogenes* em meio de cultura (TSB). As curvas estão representadas nas figuras 20 (população alta de *L. monocytogenes*) e 21 (população baixa de *L. monocytogenes*).

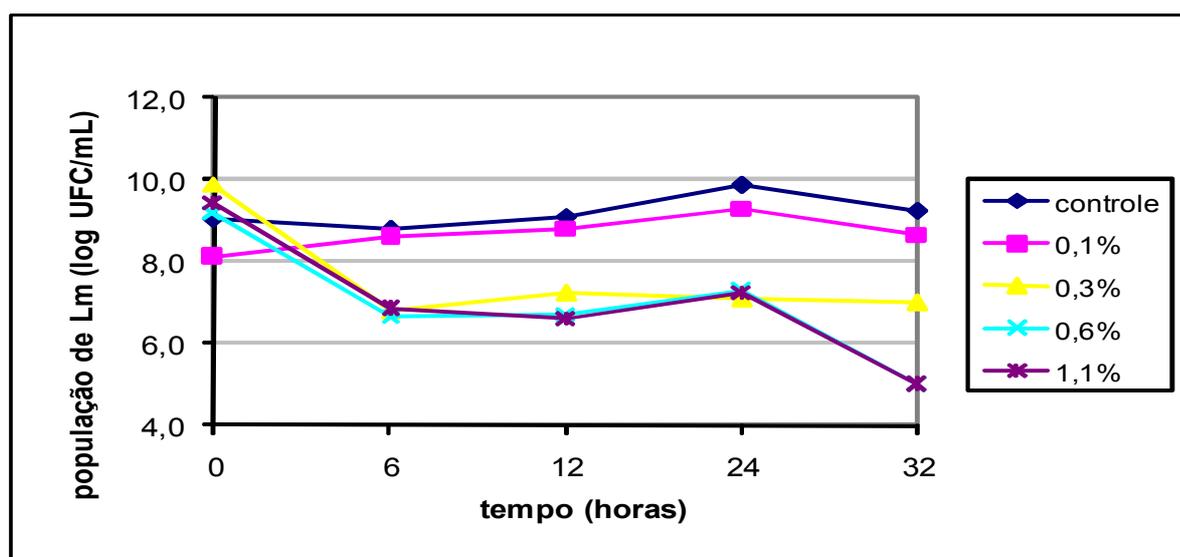


Figura 20. Comportamento de *L. monocytogenes* (população inicial de 10^9 UFC/mL) em diferentes concentrações de ácido láctico.

Na figura 20 verifica-se que a população de *L. monocytogenes* manteve-se praticamente constante (aproximadamente 10^9 UFC/mL) quando o patógeno foi inoculado somente em TSB ou em TSB + 0,1% de ácido láctico. Em TSB contendo 0,3% de ácido láctico, a população do microrganismo diminuiu 3 log já nas primeiras 6 horas e manteve-se assim até o último tempo de medição.

Essa diminuição também foi observada nos caldos adicionados de 0,6% e 1,1%; porém, nesses casos, após 24 horas houve mais um declínio da população, que atingiu 10^5 UFC/mL.

ÖZDEMIR et al. (2006) avaliaram o efeito do ácido láctico sobre Lm em carne bovina. Pedacos de carne foram imersos em uma solução contendo aproximadamente 10^8 UFC/mL de Lm e permaneceram em temperatura ambiente durante meia hora para permitir melhor fixação da bactéria. Em seguida, as amostras foram imersas em soluções contendo 1 ou 2% de ácido láctico por 15 segundos. Os autores verificaram, em 24 horas, diminuição de 0,69 log (população inicial de 6,5 log UFC/g) quando adicionado 1% do ácido e 1,1 log, com a adição de 2% de ácido láctico. Neste trabalho, observamos diminuição de aproximadamente 4 log, neste mesmo período de tempo, quando adicionado 1,1% de ácido láctico no meio TSB (figura 20). ANANG et al. (2007) avaliaram o efeito do ácido láctico na população de Lm em peito de frango cru e verificaram que, com a adição de 1% do ácido, a população diminuiu 0,95 log em apenas 30 minutos.

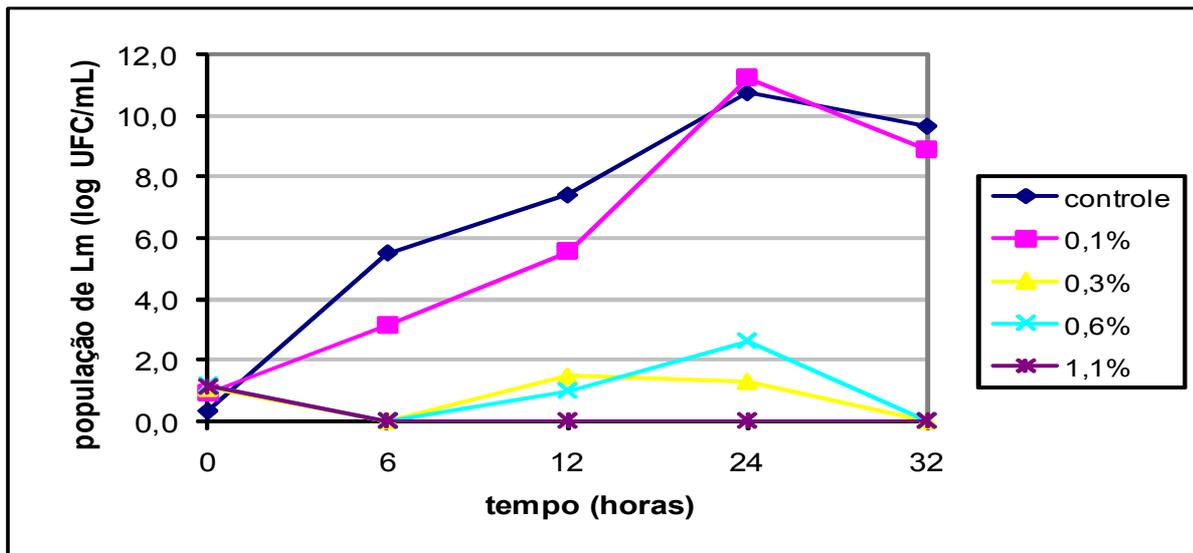


Figura 21. Comportamento de *L. monocytogenes* (população inicial de 10^1 UFC/mL) em diferentes concentrações de ácido láctico.

De acordo com o que se observa na figura 21, nos caldos sem adição de ácido láctico e com adição de 0,1% do mesmo não foi verificada inibição na multiplicação do patógeno nas primeiras 24 horas. A população de *L. monocytogenes* iniciou-se em 10^1 UFC/mL e atingiu 10^{11} UFC/mL nesse período, declinando em aproximadamente 2 log a partir de 24 horas. Nos caldos contendo 0,3% e 0,6% de ácido láctico, a população de *L. monocytogenes* ficou estável entre 6 e 24 horas, quando, em ambos os casos, declinou para níveis não detectáveis. Quando se analisou o caldo contendo 1,1% de ácido láctico, a população inicial de *L. monocytogenes* (10^1 UFC/mL) declinou para níveis não detectáveis já nas primeiras 6 horas, mantendo-se assim até o final do experimento.

Com isso, observou-se que a presença de ácido láctico em concentração igual ou superior a 0,3% pode ser inibitória para *L. monocytogenes*. Queijos produzidos com adição de coliformes apresentaram acidez em ácido láctico

maiores que 0,3%. Queijos contendo somente *Listeria*, mas acidificados com fermento láctico apresentaram valores de acidez em ácido láctico menores que os que continham coliformes, mas também maiores que 0,3% (figuras 13 e 15).

Este trabalho foi desenvolvido com o intuito de responder a uma dúvida sobre a ocorrência de Lm em queijos Minas frescal brasileiros. Não é nossa intenção sugerir que se utilizem coliformes para inibição de Lm em queijo Minas Frescal. Para o controle de Lm nesses tipos de queijos devem ser tomados outros tipos de medidas, como a utilização de matéria prima de boa qualidade microbiológica, cuidados com a saúde do manipulador, pasteurização do leite, saneamento do ambiente de produção e utensílios utilizados, cuidados para evitarem-se contaminações cruzada e pós-processamento, armazenamento dos queijos sob refrigeração. A implantação de programas de Boas Práticas de Fabricação e de Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle (APPCC) também irão garantir produtos de melhor qualidade, mais seguros.

5. CONCLUSÃO

Os coliformes exercem influência no comportamento de *Listeria monocytogenes* em queijo Minas frescal.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALEGRO, J.H.A. **Desenvolvimento de queijo Minas frescal probiótico com *Lactobacillus Acidophilus* e *Bifidobacterium lactis* isolados e em co-cultura**. São Paulo, 2003. 84p. Dissertação de Mestrado – Faculdade de Ciências Farmacêuticas – Universidade de São Paulo.

ALEXANDRE, D.P.; SILVA, M.R.; SOUZA, M.R.; SANTOS, W.L.M. Atividade antimicrobiana de bactérias lácticas isoladas de queijo-de-minas artesanal do Serro (MG) frente a microrganismos indicadores. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.54, n.4, p.424-428, 2002.

ANANG, D.M.; RUSUL, G.; BAKAR, J.; LING, F.H. Effects of lactic and lauricidin on the survival of *Listeria monocytogenes*, *Salmonella enteritidis* and *Escherichia coli* O157:H7 in chicken breast stored at 4°C. **Food Control**, v.18, p.961-969, 2007.

ARAGON-ALEGRO, L.C.; NODA, P.K.; ALEGRO, J.H.A.; LANDGRAF, M.; FRANCO, B.D.G.M.; DESTRO, M.T. Influência de coliformes na população de *Listeria monocytogenes* em queijos Minas frescal. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v.39, supl.3, p.58, res.ALN47, 2003. (Semana Farmacêutica de Ciência e Tecnologia da FCF-USP, 8, Seminário de Pós-Graduação, 18, Reunião de Iniciação Científica, 11, Semana Universitária Paulista de Farmácia e Bioquímica, 38, São Paulo, 2003).

ARAÚJO, V.S.; PAGLIARES, V.A.; QUEIROZ, M.L.P.; FREITAS-ALMEIDA, A.C. Occurrence de *Staphylococcus* and enteropathogens in soft cheese commercialized in the city of Rio de Janeiro, Brazil. **Journal of Applied Microbiology**, v.92, p.1172-1177, 2002.

ARQUÉZ, J.L.; RODRÍGUEZ, E.; GAYA, P.; MEDINA, M.; NUÑEZ, M. Effect of combinations of high-pressure treatment and bacteriocin-producing lactic acid bacteria on the survival of *Listeria monocytogenes* in raw milk cheese. **International Dairy Journal**, v.15, n.6/9, p.893-900, 2005.

BANDEIRA, R.M.; RIBEIRO, G.A. Avaliação higiênico-sanitária de queijos “tipo Minas” comercializados em Pelotas - RS. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MICROBIOLOGIA, 21, Foz do Iguaçu, 2001. **Resumos**. Rio de Janeiro: SBM, 2001. p.383.

BENKERROUM, N.; GHOUATI, Y.; SANDINE, W.E.; TANTAQUI-ELARAKI. Methods to demonstrate the bactericidal activity of bacteriocins. **Letters in Applied Microbiology**, v.17, p.78-81, 1993.

BERESFORD, T.P.; FITZSIMONS, N.A.; BRENNAN, N.L.; COGAN, T.M. Recent advances in cheese microbiology. **International Dairy Journal**, v.11, p.259-274, 2001.

BRANCO, M.A.A.C.; FIGUEIREDO, E.A.T.; BORGES, M.F.; SILVA, M.C.D.; DESTRO, M.T. Incidência de *Listeria monocytogenes* em queijo de coalho refrigerado produzido industrialmente. **Boletim do CEPPA**, v.21, n.2, p.393-408, 2003.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Legislação. VisaLegis. **Resolução RDC, de 12 de 02 de janeiro de 2001**. O Ministério da Saúde aprova o regulamento técnico sobre os padrões microbiológicos para alimentos. Disponível em: <http://e-legis.anvisa.gov.br/leisref/public/showAct.php?id=144&word=>. Acesso em: 20 fev. 2003.

BRASIL. Instrução Normativa n.22, de 14 de abril de 2003. O Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento oficializa os métodos analíticos oficiais físico-químicos, para controle de leite e produtos lácteos. **Diário Oficial da União**, Brasília, n.83, 2 mai. 2003. Seção I, p.3.

BRASIL. Portaria n.352, de 4 de setembro de 1997. O Ministério de Estado da Agricultura e do Abastecimento institui o regulamento técnico para fixação de identidade e qualidade do queijo Minas frescal. In: SANTOS, J.A., ed. **Nova legislação de produtos lácteos e de alimentos para fins especiais, diet, light e enriquecidos**. São Paulo: Fonte Comunicações, 1998. p.76-78.

BULA, C.J.; BILLE, J.; GLAUSER, M.P. An epidemic of food-borne listeriosis in Western Switzerland: description of 57 cases involving adults. **Clinical Infectious Diseases**, v.20, n.1, p.66-72, 1995.

BURITI, F.C.A.; ROCHA, J.S.; ASSIS, E.G.; SAAD, S.M.I. Probiotic potential of Minas fresh cheese prepared with addition of *Lactobacillus paracasei*. **LWT - Food Science and Technology**, v.38, p.173-180, 2005a.

BURITI, F.C.A.; ROCHA, J.S.; SAAD, S.M.I. Incorporation of *Lactobacillus acidophilus* in Minas fresh cheese and its implications for textural and sensorial

properties during storage. **International Dairy Journal**, v.15, p.1279-1288, 2005b.

CAMPOS, A.C. **Efeito do uso combinado de ácido láctico com diferentes proporções de fermento láctico mesofílico no rendimento, proteólise, qualidade microbiológica e propriedades mecânicas do queijo Minas frescal**. Campinas, 2000. 80p. Dissertação de Mestrado – Faculdade de Engenharia de Alimentos – Universidade de Campinas.

CARLIN, F.; NGUYEN-THE, C.; MORRIS, C.E. Influence of background microflora on *Listeria monocytogenes* on minimally processed fresh broad-leaved endive (*Cichorium endivia* var. *latifolia*). **Journal of Food Protection**, v.59, n.7, p.698-703, 1996.

CASSAROTTI, V.T.; GALLO, C.R.; CAMARGO, R. Ocorrência de *Listeria monocytogenes* em leite cru, leite pasteurizado tipo C e queijo Minas frescal comercializados em Piracicaba – SP. **Archivos Latinoamericanos de Nutrición**, v.44, p.158-136, 1994.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. Outbreak of listeriosis associated with homemade Mexican-style cheese – United States. 2002. **MMWR - Morbidity and Mortality Weekly Report**, v.50, n.26, p.560-562, 2001. Disponível em: <http://www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml/mm5026a3.htm>. Acesso em: 12 mar. 02.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. Preliminary FoodNet data on the incidence of infection with pathogens transmitted commonly through food- selected sites, United States. 2004. **MMWR - Morbidity and Mortality Weekly Report**, v.53, n.16, p.338-343, 2004. Disponível em: <http://www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml/mm5316a2.htm> Acesso em: 30 abr. 04.

CONNER, D.E.; SCOTT, V.N.; BERNARD, D.T. Growth, inhibition and survival of *Listeria monocytogenes* as affected by acid conditions. **Journal of Food Protection**, v.53, n.8, p.652-655, 1990.

CORBIA, A.C.G.; NASCIMENTO, M.G.F.; NASCIMENTO, E.R.; LIGNON, G.B. Research on *Listeria monocytogenes* and total plate count in Minas soft cheese. **Revista Brasileira de Medicina Veterinária**, v.23, n.2, p.72-75, 2001.

CORDANO, A.M.; ROCOURT, J. Occurrence of *Listeria monocytogenes* in food in Chile. **International Journal of Food Microbiology**, v.70, p.175-178, 2001.

DESTRO, M.T.; SERRANO, A.M.; KABUKI, D.I. Isolation of *Listeria* species from some Brazilian meat and dairy products. **Food Control**, v.2, p.110-112, 1991.

DORMAN, H.J.D.; DEANS, S.G. Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. **Journal of Applied Microbiology**, v.88, p.303-316, 2000.

DORNELLAS, J.R. **Efeito do tipo de coagulante e acidificante no rendimento, proteólise e shelf-life do queijo Minas Frescal**. Campinas, 1997. 197p. Dissertação de Mestrado - Faculdade de Engenharia de Alimentos - UNICAMP.

EL-MARRAKCHI, A.; HAMAMA, A.; EL OTHMANI, F. Occurrence of *Listeria monocytogenes* in milk and dairy products produced or imported into Marocco. **Journal of Food Protection**, v.56, n.3, p.256-259, 1993.

FALEIRO, M.L.; ANDREW, P.W.; POWER, D. Stress response of *Listeria monocytogenes* isolated from cheese and other foods. **International Journal of Food Microbiology**, v.84, p.207-216, 2003.

FARIAS, L.M.; TOTOLA, A.H.; MIRANDA, C.M.S.; CARVALHO, M.A.R.; DAMASCENO, C.A.V.; TAVARES, C.A.P.; CISALPINO, E.O.; VIEIRA, E.C. Extraction, partial purification and characterization of a bacteriocin (fragilicin) produced by a strain of *Bacteroides fragilis* isolated from *Callinthriz penicillata*. **Research in Microbiology**, v.145, p.9-16, 1994.

FENG, P.; WEAGANT, S.D.; GRANT, M.A. Enumeration of *Escherichia coli* and the coliform bacteria. In: UNITED STATES. Food and Drug Administration. A-Z Index. CFSAN (Center for Food Safety and Applied Nutrition). Guidance Documents. Food Processing. **Bacteriological Analytical Manual Online (2001)**. cap.4. Disponível em: <http://www.cfsan.fda.gov/~ebam/bam-4.html>. Acesso em: 15 maio 04.

FOX, P.F.; LUCEY, J.A.; COGAN, T.M. Glycolysis and related reactions during cheese manufacture and ripening. **Food Science and Nutrition**, v.29, n.4, p.237-253, 1990.

FOX, P.F.; GUINEE, T.P.; COGAN, T.M.; McSWEENEY, P.L.H. **Fundamentals of cheese science**. Gaithersburg: Aspen, 2000. 587p.

FURTADO, M.M. **Principais problemas dos queijos**: causas e prevenção. São Paulo: Fonte, 1999. 176p.

FURTADO, C.M.; RODRIGUES, J.; LIMA, C.L.A.; SOUZA, M.L. Características microbiológicas de queijo Minas Frescal consumido em Rio Branco. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS, 20, Curitiba, 2006. **Resumos**: alimentos e agroindústrias brasileiras no contexto internacional. Curitiba: SBCTA, 2006. p.233.

GARCIA-CRUZ, C.H.; HOFFMANN, F.L.; VINTURIM, T.M.; LEITE-HOFFMANN, F. Microbiological study of farm-produced Minas frescal cheese sold in the city of São José do Rio Preto, SP, Brazil. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v.54, n.2, p.78-82, 1994.

GHRAIRI, T.O.; MANAI, M.O.; BERJEAUD, J.M.O.; FRÈRE, J. Antilisterial activity of lactic acid bacteria isolated from rigouta, a traditional Tunisian cheese. **Journal of Applied Microbiology**, v.97, p.621-628, 1994.

GOULET, V.; JACQUET, C.; VAILLANT, V.; REBIERE, I.; MOURET, E.; LORENTE, C.; MAILLOT, E.; STAINER, F.; ROCOURT, J. Listeriosis from consumption of raw-milk cheese. **Lancet**, v.345, n.8964, p.1581-1582, 1995. [Letter].

GRAVES, L.M.; SWAMINATHAN, B. PulseNet standardized protocol for subtyping *Listeria monocytogenes* by macrorestriction and pulsed-field gel electrophoresis. **International Journal of Food Microbiology**, v.65, n.1-2, p.55-62, 2001.

HALL, P.A.; LEDENBACH, L.; FLOWERS, R.S. Acid-producing microorganisms. In: VANDERZANT, C.; SPLITTSTOESSER, D.F., eds. **Compendium of methods for the microbiological examination of food**. Washington: American Public Health Association, 2001. p.201-207.

HEALTH CANADA. Listeriosis: British Columbia – Canadá. 2002. Disponível em: http://www.phac-aspc.gc.ca/bid-bmi/dsd-dsm/nb-ab/2002/nb3502_e.html. Acesso em: 23 out. 03.

HERREROS, M.A.; SANDOVAL, H.; GONZÁLEZ, L.; CASTRO, J.M.; FRESNO, J.M.; TORNADIJO, M.E. Antimicrobial activity and antibiotic resistance of lactic acid bacteria isolated from Armada cheese (a Spanish goat's milk cheese). **Food Microbiology**, v.22, p.455-459, 2005.

HORLD HEALTH ORGANIZATION. WHO Sites. Food Safety. Publications. Microbiological Risks Publications. **Principles and guidelines for the conduct of microbiological risk assessment, CAC/GL-30 (1999)**. Disponível em: <http://www.who.int/foodsafety/publications/micro/cac1999/en/index.html>. Acesso em: 20 abr. 2004.

INTERNATIONAL COMMISSION ON MICROBIOLOGICAL SPECIFICATIONS FOR FOODS. **Microbiological specifications of food pathogens**. London: Blakie Academic & Professional, 1996. 513p. (Microorganisms in foods, v.5).

INTERNATIONAL COMMISSION ON MICROBIOLOGICAL SPECIFICATIONS FOR FOODS. **Microbiological testing in food safety management**. New York: Kluwer Academic, 2002. 362p. (Microorganisms in foods, v.7).

INTERNATIONAL SOCIETY FOR INFECTIOUS DISEASES. ProMED-mail. Listeriosis, fatal - SWITZERLAND (NEUENBURG): ALERT. 2005. Disponível em: http://www.promedmail.org/pls/promed/f?p=2400:1202:10228488191938388996::NO::F2400_P1202_CHECK_DISPLAY,F2400_P1202_PUB_MAIL_ID:X,29231. Acesso em: 8 jun. 05.

INTERNATIONAL SOCIETY FOR INFECTIOUS DISEASES. ProMED-mail. Yersiniosis, listeriosis - Canada (Ontario): Unpasteurized milk / cheese. 2007. Disponível em: http://www.promedmail.org/pls/promed/f?p=2400:1202:1291109096221413618::NO::F2400_P1202_CHECK_DISPLAY,F2400_P1202_PUB_MAIL_ID:X,36763. Acesso em: 3 abr. 07.

JAY, J.M. **Modern food microbiology**. 6.ed. Gaithersburg: Aspen Publication, 2000. 679p. (Aspen food science text series).

KANG, D.-H., FUNG, D.Y.C. Thin agar layer method for recovery of heat-injured *Listeria monocytogenes*. **Journal of Food Protection**, v.62, n.11, p.1346-1349, 1999.

KORNACKI, J.L.; JOHNSON, J.L. *Enterobacteriaceae*, coliforms, and *Escherichia coli* as quality and safety indicators. In: VANDERZANT, C., SPLITTSTOESSER, D.F. **Compendium of methods for the microbiological examination of foods**. Washington: Edward Brothers, 2001. p.69-82.

LINNAN, M.J.; MASCOLA, L.; LOU, X.D.; GOULET, V.; MAY, S.; SALMINEN, C.; HIRD, D.W.; YONEKURA, M.L.; HAYES, P.; WEAVER, R. Epidemic listeriosis associated with mexican-style cheese. **New England Journal of Medicine**,

v.319, n.13, p.823-828, 1988.

LITTELL, R.C.; MILLIKEN, G.A.; STROUP, W.W.; WOLFINGER, R.D. **SAS system for mixed models**. Cary: SAS Institute, 1996. 633p.

LONCAREVIC, S.; DANIELSSON-THAM, M.L.; THAM, W. Occurrence of *Listeria monocytogenes* in soft and semi-soft cheeses in retail outlets in Sweden. **International Journal of Food Microbiology**, v.26, n.2, p.245-250, 1995.

LOU, Y.; YOUSEF, A.E. Characteristics of *Listeria monocytogenes* important to food processors. In: RISER, E.T.; MARTH, E.H., eds. **Listeria, listeriosis and food safety**. New York: Marcel Dekker, 1999.

LOURENÇO NETO, J.P.M. O uso de culturas lácticas na fabricação de Minas Frescal como alternativa de melhoria de qualidade. **I Seminário Internacional de "Queijos frescos"**. Atibaia, p.59-75, 1998.

MALAKAR, P.K.; BARKER, G.C.; ZWIETERING, M.H.; VAN 'T RIET, K. Relevance of microbial interactions topredictive microbiology. **International Journal of Food Microbiology**, v.84, p.263-272, 2003.

MANFREDA, G.; DE CESARE, A.; STELLA, S.; COZZI, M.; CANTONI, C. Occurrence and ribotypes of *Listeria monocytogenes* in Gorgonzola cheeses. **International Journal of Food Microbiology**, v.102, n.3, p.287-293, 2005.

MAYR-HARTING, A.; HEDGES, A.J.; BERKELY, R.C.W. Methods for studying bacteriocins. In: NORRIS, J.R.; RIBBONS, D.W., eds. **Methods in microbiology**. New York: Academic Press, 1972. v.7A, p.315-422.

MEAD, P.S.; SLUTSKER, L.; DIETZ, V.; McCAIG, L.F.; BRESSE, J.S.; SHAPIRO, C.; GRIFFIN, P.M.; TAUXE, R.V. Food-related illness and death in the United States. **Emerging Infectious Diseases**, v.5, p.607-625, 1999.

MENA, C.; ALMEIDA, G.; CARNEIRO, L.; TEIXEIRA, P.; HOGG, T.; GIBBS, P.A. Incidence of *Listeria monocytogenes* in different food products commercialized in Portugal. **Food Microbiology**, v.21, p.213-216, 2004.

NALDINI, M.C.M. **Comportamento diferencial de *Listeria monocytogenes* em queijos Minas Frescal elaborados pelo método convencional e por acidificação direta**. Campinas, 2002, 72p. Dissertação de Mestrado – Faculdade de Engenharia de Alimentos - UNICAMP.

NASCIMENTO, D.; SABIONI, J.G.; PIMENTA, N.; XANDÓ, S.R. Avaliação microbiológica de queijos tipo Minas Frescal da cidade de Ouro Preto (MG). **Boletim da Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.19, n.2, p.120-129, 1995.

NERO, L.A. ***Listeria monocytogenes* e *Salmonella* spp. em leite cru produzido em quatro regiões leiteiras no Brasil: ocorrência e fatores que interferem na sua detecção.** São Paulo, 2005. 141p. Tese de Doutorado – Faculdade de Ciências Farmacêuticas – Universidade de São Paulo.

OLIVEIRA, C.A.F.; MORENO, J.F.G.; MESTIERI, L. Características físico-químicas e microbiológicas de queijos Minas frescal e mussarela, produzidos em algumas fábricas de laticínios do estado de São Paulo. **Higiene Alimentar**, v.12, n.55, p.31-34, 1998.

ÖZDEMİR, H.; YILDIRIM, Y.; KÜPLÜLÜ, Ö.; KOLUMAN, A.; GÖNCÜOĞLU, M.; INAT, G. Effects of lactic acid and hot water treatments on *Salmonella* Typhimurium and *Listeria monocytogenes* on beef. **Food Control**, v.17, p.299-303, 2006.

PAGOTTO, F.; DALEY, E.; FARBER, J.; WARBURTON, D. Isolation of *Listeria monocytogenes* from all food and environmental samples. In: HEALTH CANADA. Food & Nutrition. Research Programs & Analytical Methods. Analytical Methods. Microbiological Methods. Compendium of Analytical Methods, v.2, MFHPB-30, 2001. Disponível em: http://www.hc-sc.gc.ca/fn-an/res-rech/analy-meth/microbio/volume2/mfhp30-01_e.html. Acesso em: 4 dez. 03.

PATCHETT, R.A.; KELLY, A.F.; KROLL, R.G. Effect of sodium chloride on the intracellular solute pools of *Listeria monocytogenes*. **Applied and Environmental Microbiology**, v.58, p.3959-3963, 1992.

PEREIRA, M.L.; LARA, M.A.; DIAS, R.S.; CARMO, L.S. Intoxicação por *Staphylococcus aureus* provocada por queijo "tipo Minas". **Revista de Microbiologia**, v.22, n.4, p.349-350, 1991.

PEREIRA, M.L.; GASTELOIS, M.C.A.; BASTOS, E.M.A.F.; CAIAFFA, W.T.; FALEIRO, E.S.C. Enumeração de coliformes fecais e presença de *Salmonella* sp. em queijo Minas. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.51, n.5, p.427-431, 1999.

PINI, P.N.; GILBERT, R.J. The occurrence in the U.K. of *Listeria* species in raw chickens and soft cheeses. **International Journal of Food Microbiology**, v.6, n.4, p.317-326, 1988.

PINTADO, C.M.B.S.; OLIVEIRA, A.; PAMPULHA, M.E.; FERREIRA, M.A.S.S. Prevalence and characterization of *Listeria monocytogenes* isolated from soft cheeses. **Food Microbiology**, v.22, p.79-85, 2005.

RORVICK, L.M.; YNDESTAD, M. *Listeria monocytogenes* in foods in Norway. **International Journal of Food Microbiology**, v.13, n.2, p.97-104, 1991.

RYSER, E.T.; DONNELLY, C.W. *Listeria*. In: VANDERZANT, C., SPLITTSTOESSER, D.F. **Compendium of methods for the microbiological examination of foods**. Washington: Edward Brothers, 2001. p.343-353.

SAAD, S.M.I.; VANZIN, C.; OLIVEIRA, M.N.; FRANCO, B.D.G.M. Influence of lactic acid bacteria on survival of *Escherichia coli* O157:H7 in inoculated Minas cheese during storage at 8,5°C. **Journal of Food Protection**, v.64, n.8, p.1151-1155, 2001.

SALOTTI, B.M.; CARVALHO, A.C.F.B.; AMARAL, L.A.; VIDAL-MARTINS, A.M.C.; CORTEZ, A.L. Qualidade microbiológica do queijo Minas frescal comercializado no Município de Jaboticabal, SP, Brasil. **Arquivos do Instituto Biológico**, v.32, n.2, p.171-175, 2006.

SCHITTLER, L.; FIORENTINI, A.M.; DEWES, A.D.; POLICENA, J.C.; KLAJN, V.M.; TONDO, E.C. Avaliação da interferência de coliformes no isolamento de *Listeria* sp através de método microbiológico tradicional e método imunológico rápido (ELISA). In: CONGRESSO BRASILEIRO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS, 18, Porto Alegre, 2002. **Anais**. Porto Alegre: SBCTA, 2002. p.3342-3345.

SHAH, N.P. Probiotic bacteria: selective enumeration and survival in dairy foods. **Journal of Dairy Science**, v.83, n.4, p.894-907, 2000.

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

SILVA, M.C.D.; DESTRO, M.T.; TIBANA, A. Correlação entre população de coliformes fecais e a presença de *Listeria monocytogenes* em queijos. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS, 18, Porto Alegre, 2002. **Anais**. Porto Alegre: SBCTA, 2002. p.114.

SOUSA, C.I.; SILVA, S.G.; MORGADO, F.A.F. Ocorrência de coliforme fecal e *Staphylococcus aureus* em amostras de queijo Minas Frescal comercializados

na cidade de Belém – Pará. In: CONGRESSO LATINO AMERICANO DE MICROBIOLOGIA E HIGIENE DE ALIMENTOS (COMBHAL), 5, Águas de Lindóia, 1998. **Resumos**. São Paulo: ICMSF, 1998. p.101.

TAGG, J.R.; MCGIVEN; A.R. Assay system for bacteriocins. **Applied Microbiology**, v.21, n.5, p.943, 1971.

TOLEDO, M.R.F.; FONTES, C.F.; TRABULSI, L.R. EPM – modificação do meio Rugai e Araujo para realização simultânea dos testes de produção de gás a partir de glucose, H₂S, urease e triptofano desaminase. **Revista de Microbiologia**, v.13, p. 309-315, 1982a.

TOLEDO, M.R.F.; FONTES, C.F.; TRABULSI, L.R. Um meio para a realização dos testes de motilidade, indol e lisina descarboxilase. **Revista de Microbiologia**, v.13, p. 230-235, 1982b.

TOMÉ, E.; TEIXEIRA, P.; GIBBS, P.A. Anti-listerial inhibitory lactic acid bacteria isolated from commercial cold smoked salmon. **Food Microbiology**, v.23, p.399-408, 2006.

UNITED STATES. Food and Drug Administration. **Triunfo Import Food Corp. Recalls queijo tipo mineiro Cheese – United States**. 2003a. Disponível em: http://www.fda.gov/oc/po/firmrecalls/triunfo10_03.html. Acesso em: 29 out. 03.

UNITED STATES. Department of Agriculture. Food Safety and Inspection Service. Centers for Disease Control and Prevention. Science. Risk Assessments. **Quantitative assessment of relative risk to public health from foodborne *Listeria monocytogenes* among selected categories of ready-to-eat foods**. S.l.: FDA, USDA, CDC, 2003b. Disponível em: <http://www.foodsafety.gov/~dms/lmr2-toc.html>. Acesso em: 28 abr.04.

VARNAM, A.H.; EVANS, M.G. *Escherichia coli*. In: _____. **Foodborne pathogens: an illustrated text**. London: Wolfe, 1991. p.101-128.

VIEIRA, S.D.; POIATTI, M.L.; SCHOCKEN-ITURRINO, R.P.; VIEIRA, H.; ANDRADE. T.M. *Listeria monocytogenes* in type “Minas Frescal” craft cheese, marketed in the area of Araguaína – TO. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MICROBIOLOGIA, 21, Foz do Iguacu, 2001. **Resumos**. Rio de Janeiro: SBM, 2001a. p.405.

VIEIRA, S.D.; POIATTI, M.L.; SCHOCKEN-ITURRINO, R.P.; VIEIRA, H.; ANDRADE, T.M.; ROMA, J.M. Rising of total and faecal coliforms and characterization of *E. coli* in type "Minas frescal" cheese of the area of Araguaína – TO. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MICROBIOLOGIA, 21, Foz do Iguaçu, 2001. **Resumos**. Rio de Janeiro: SBM, 2001b. p.415.

WORLD HEALTH ORGANIZATION, FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS. Hazard characterization for pathogens in food and water: guidelines. Geneva: FAO/WHO, 2003. 61p. (Microbiological risk assesment series, 3).