

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RECÔNCAVO DA BAHIA
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS, AMBIENTAIS E BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL
CURSO DE MESTRADO**

**OCORRÊNCIA DE MICRORGANISMOS INDICADORES E
PATOGENICOS EM REQUEIJÕES DO NORTE.**

MARGARETE DE JESUS RODRIGUES

**CRUZ DAS ALMAS - BAHIA
JANEIRO - 2015**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RECÔNCAVO DA BAHIA
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS, AMBIENTAIS E BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL
CURSO DE MESTRADO**

MARGARETE DE JESUS RODRIGUES

Bióloga

Universidade Federal do Recôncavo da Bahia - 2010

Dissertação submetida ao Colegiado do Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia e, como requisito parcial para obtenção do Grau de Mestre em Ciência Animal. Área de concentração: Produção Animal.

Orientadora:

Prof^a. Dr^a. Ludmilla Santana Soares e Barros

Co-orientador:

Prof^o Dr. Sílvio Luiz de Oliveira Sógliã

CRUZ DAS ALMAS - BAHIA

JANEIRO – 2015

FICHA CATALOGRÁFICA

R696o	<p>Rodrigues, Margarete de Jesus. Ocorrência de microrganismos indicadores e patogênicos em requeijões do norte / Margarete de Jesus Rodrigues. Cruz das Almas, BA, 2015. 105f.; il.</p> <p>Orientadora: Ludmilla Santana Soares e Barros. Coorientador: Silvio Luiz de Oliveira Sógia.</p> <p>Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Centro de Ciências Agrárias, Ambientais e Biológicas.</p> <p>1.Alimentos – Requeijão. 2.Alimentos – Microbiologia. 3.Microrganismos – Análise. I.Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Centro de Ciências Agrárias, Ambientais e Biológicas. II.Título.</p> <p>CDD: 576.163</p>
-------	---

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RECÔNCAVO DA BAHIA
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS, AMBIENTAIS E BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL
CURSO DE MESTRADO**

**COMISSÃO EXAMINADORA DA DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE
MARGARETE DE JESUS RODRIGUES**

Prof^a. Dr^a. Ludmilla Santana Soares e Barros - Orientadora
Universidade Federal do Recôncavo da Bahia

Geógenes da Silva Gonçalves
Faculdade de Tecnologia e Ciências da Bahia

Isabella de Matos Mendes da Silva
Universidade Federal do Recôncavo da Bahia

**CRUZ DAS ALMAS - BAHIA
JANEIRO – 2015**

Aos meus pais, Helena de Jesus
Rodrigues e Nicanor José
Rodrigues (*in memoriam*) a quem
devo tudo que sou.

AGRADEÇO E DEDICO ESTE TRABALHO

Ao grande arquiteto do universo, que é Deus, que findo os seis dias de trabalho, nos brindou com a fauna e a flora, e todos os ambientes que os circundam, necessários ao desenvolvimento sadio aqui na Terra, para que pudéssemos através dos estudos, compreender um pouco mais sobre o mundo em que vivemos,

Meu muito obrigada.

Aos meus familiares, pais, irmãos e irmãs, sobrinhos e sobrinha.

Ao meu marido, Marlon Soares que muito me ajudou em mais uma etapa da minha vida acadêmica - meu muito obrigada.

A estagiária de medicina veterinária, Danuza das Virgens Lima, que por todas às vezes me auxiliou nos processamentos das amostras, sem você com certeza não teria sido tão bom e descontraído como foi. A você, minha fiel escudeira, meu muito obrigada por toda dedicação, empenho, companhia e boa vontade.

Aos meus colegas do curso de mestrado, por terem participado de uma das fases mais gostosas de minha vida, em especial à Iracema Carvalho pelo incentivo e bons conselhos, Caroline Mendes pela companhia, diálogo e início de uma bela amizade, Suélen, Luanda, Haiala, Daniela por toda a atenção dispensada, por proporcionarem momentos inesquecíveis ao longo deste período, são colegas assim que todos deveriam ter.

À Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, pela oportunidade da realização do curso de mestrado.

À CAPS, pelo auxílio financeiro.

A todos que, direta ou indiretamente, contribuíram na realização deste trabalho.

E, por fim, agradeço à Professora Dra. Ludmilla Santana Soares e Barros, que sem dúvida foi a minha maior incentivadora do curso de mestrado, desde a graduação, sempre esteve presente. As suas contribuições foram de extrema importância para o meu crescimento profissional. Não tenho palavras para agradecer o seu empenho por sempre estar presente em minha vida pessoal e profissional mesmo de longe, seja através de uma mensagem no celular, de um email ou de uma ligação com palavras de carinho, incentivo e de conforto, e além de tudo o que fez, ainda fez algo ímpar: orientou-me.

SUMARIO

	Página
LISTA DE TABELAS	
LISTA DE GRÁFICOS	
LISTA DE FIGURAS	
LISTA DE ABREVIATURAS E SÍGLAS	
RESUMO	
ABSTRAT	
1 INTRODUÇÃO	14
2 REVISÃO DE LITERATURA	16
2.1 Produção do queijo tipo Requeijão.....	16
2.2 Dentre as bactérias causadoras de contaminação nos requeijões, destaca-se a <i>Escherichia coli</i>	19
2.3 Dentre as cepas de <i>E. coli</i> existe um grupo capaz de provocar doenças em indivíduos humanos, coletivamente chamadas de <i>Escherichia coli</i> O157.....	22
2.4 Mecanismo de patogenicidade da <i>E. coli</i> O157.....	25
2.5 Fontes de contaminação da <i>E. coli</i> O157.....	28
2.6 Além dos microrganismos patogênicos, existem os indicativos como os Coliformes totais.....	30
2.7 Dentre os microrganismos deteriorantes, podemos citar os microrganismos Mesófilos e os Psicotróficos.....	32
2.8 Os Fungos filamentosos (bolores) e Leveduras também são microrganismos deteriorantes.....	32
2.9 Saúde pública.....	37
3 MATERIAL E MÉTODOS	39
3.1 Obtenção das Amostras.....	39
3.2 Análises Microbiológicas.....	39
3.3 Contagem de Microrganismos Mesófilos Aeróbios Estritos e Facultativos Viáveis.....	40
3.4 Contagem de Microrganismos Psicotróficos Aeróbios Estritos e Facultativos Viáveis.....	41
3.5 Contagem de Fungos filamentosos (bolores) e Leveduras.....	42
3.6 Contagem de coliformes totias e <i>E. coli</i>	43
3.7 Propagação e Manutenção das Colônias.....	44
3.8 Enriquecimento Seletivo de <i>E. coli</i> Enterohemorrágica (EHEC) das colônias	44
3.9 Teste para obtenção de <i>Escherichia coli</i> O157.....	45
3.10 Análise Estatística.....	46
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	49
5 CONCLUSÃO	62
6 AGRADECIMENTOS	63
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	64
8 CONSIDERAÇÕES FINAIS	75
CAPÍTULO 1	89
Ocorrência de coliformes e <i>Escherichia coli</i> O157 em amostras de requeijão do norte.....	76
ANEXO 1	96

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Análise de Variância dos valores absolutos das concentrações de Microrganismos Mesófilos.....	46
Tabela 2	Análise de Variância dos valores absolutos das concentrações de Microrganismos Psicotróficos.....	46
Tabela 3	Análise de Variância dos valores absolutos das concentrações de Bolor e Leveduras.....	47
Tabela 4	Resultados do desvio padrão e coeficiente de variação dos Coliformes totais e <i>E. coli</i> analisadas nas cidades de Faria de Santana e Cruz das Almas.....	48
Tabela 5	Presença ou ausência de <i>Escherichia coli</i> O157, obtidos nas amostras de Requeijão do Município de Cruz da Almas – BA. Fevereiro a junho de 2014.....	60
Tabela 6	Presença ou ausência de <i>Escherichia coli</i> O157, obtidos nas amostras de Requeijão do Município de Feira de Santana – BA. Fevereiro a junho de 2014.....	61

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1	Valores das concentrações de Microrganismos Mesófilos, obtidas nas amostras de Requeijão do Município de Feira de Santana e Cruz das Almas – BA. Fevereiro a junho de 2014.....	51
Gráfico 2	Valores das concentrações de Microrganismos Psicrotróficos, obtidas nas amostras de Requeijão do Município de Feira de Santana e Cruz das Almas – BA. Fevereiro a junho de 2014.....	52
Gráfico 3	Valores das concentrações de Bolores e Leveduras, obtidas nas amostras de Requeijão do Município de Feira de Santana e Cruz das Almas – BA. Fevereiro a junho de 2014.....	54
Gráficos 4	Valores das concentrações de Coliformes totais (CT), obtidas nas amostras de Requeijão do Município de Feira de Santana e Cruz das Almas – BA. Fevereiro a junho de 2014.....	57
Gráficos 5	Valores das concentrações de <i>E. coli</i> , obtidas nas amostras de Requeijão do Município de Feira de Santana e Cruz das Almas – BA. Fevereiro a junho de 2014.....	58

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Requeijão vendido em feiras livres.....	39
Figura 2	Placa de Petri contendo colônias de microrganismos mesófilos em Agar Contagem Padrão (PCA).....	41
Figura 3	Placa de Petri contendo colônias de microrganismos psicrotróficos em Agar Contagem Padrão (PCA).....	42
Figura 4	Placa de Petri contendo fungos crescidos em Agar Sabouraud Dextrose.....	43
Figura 5	Placa de Petri contendo colônias de coliformes totais e <i>E. coli</i> em Chromocult Coliformes Agar.....	44
Figura 6	Teste Singlepath <i>E. coli</i> O157 estéreo.....	45
Figura 7	Teste Singlepath <i>E. coli</i> O157 negativo para <i>E. coli</i> O157....	45
Figura 8	Teste Singlepath <i>E. coli</i> O157 com confirmação positiva para <i>E. coli</i> O157.....	45

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária do Ministério da Saúde
AMT	Amostra
β -D-Gal	β -D-Galactose
CA-FL	Cruz das Almas – feira livre
CA-S	Cruz das almas - supermercado
CT	Coliformes Termotolerantes
CV	Coeficiente de variação
DAEC	Difuso aderente
DTAs	Doenças transmitidas por alimentos
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EAEC	<i>E. coli</i> enteroagregativa
EHEC	<i>E. coli</i> enterohemorrágica
EIEC	<i>E. coli</i> enteroinvasiva
EPEC	<i>E. coli</i> enteropatogênica
ETEC	<i>E. coli</i> enterotoxigênica
FL	Feira livre
FSA – FL	Feira de Santana – Feira livre
FSA - S	Feira de Santana - Supermercado
GST	Teor de gordura dos sólidos totais
HC	Colite hemorrágica
HUS	Síndrome Urêmica hemolítica
Log.UFC/g	Logaritmo vezes unidade formadora de colônia por grama
MAPA	Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento.
MUG	4-metilumbeliferil- β -D glucoronídeo
NMP	Número mais provável
PCA	Agar contagem padrão
PTT	Púrpura trombocitopênica trombótica
S	Supermercado
STEC	<i>E. coli</i> Shigatoxigênica
STx	Toxina Shiga
UPEC	<i>E. coli</i> uropatogênica
UV	Ultravioleta
VM	Vermelho de metila
VRB	Agar vermelho violeta bile
VTEC	<i>E. coli</i> verotoxigênica

OCORRÊNCIA DE MICRORGANISMOS INDICADORES E PATOGÊNICOS EM REQUEIJÕES DO NORTE.

Autora: Margarete de Jesus Rodrigues

Orientadora: Ludmilla Santana Soares e Barros

Resumo: Este trabalho teve como objetivo avaliar a qualidade microbiológica do requeijão do norte comercializado em feiras livres e supermercados das cidades de Feira de Santana e Cruz das Almas - Bahia, através da contagem de microrganismos mesófilos e psicrotróficos, bolores e leveduras, coliformes totais e *E. coli* e a ocorrência de *E. coli* O157. Foram coletadas 68 amostras de requeijão, no período de fevereiro a junho de 2014. As análises para cada microrganismo foi baseada na Instrução Normativa nº 62, de 26 de agosto de 2003 do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), obedecendo às sucessivas diluições tempo e temperatura de cada microrganismo estudado. A contagem das colônias foram expresso em Unidades Formadora de Colônia por mL de amostra (UFC/mL). Para presença de *Escherichia coli* O157, foram transferidas para o teste Singlepath *E. coli* O157 colônias proveniente do meio de cultura MEC Broth com Novobiocina. Em relação à presença dos microrganismos estudados, todas apresentaram: 100% de contaminação para microrganismos mesófilos, 51,47% para psicrotróficos, 98,53% para bolores e leveduras, 88,24% para coliformes totais, 77,94% para *E. coli* e 22% para o sorotipo *E. coli* O157. Os requeijões comercializados nas feiras livres e supermercados das cidades de Feira de Santana e Cruz das Almas apresentam-se em condições higiênicas insatisfatórias, colocando em risco a saúde do consumidor. O requeijão é um excelente meio de cultura, pois além do alto índice de umidade é rico em nutrientes o que favorece o crescimento de microrganismos. Assim o requeijão é facilmente contaminado por microrganismos durante todo processo de produção até a comercialização.

Palavras-chave: *Escherichia coli*, Higiene, Bactérias, Fungos.

OCCURRENCE OF INDICATORS AND PATHOGENIC MICROORGANISMS IN NORTHERN curd.

Autora: Margarete de Jesus Rodrigues

Orientadora: Ludmilla Santana Soares e Barros

Abstract: This study aimed to evaluate the microbiological quality of the northern cheese sold in street markets and supermarkets in the cities of Feira de Santana and Cruz das Almas – Bahia, by mesophilic and psychrotrophic count, molds and yeasts, total coliforms and *E. coli* and the occurrence of *E. coli* O157. The 68 curd samples were collected from February to June 2014. The analysis for each microorganism was based on Normative Instruction N°. 62, of August 26, 2003 the Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), according to the successive dilutions, time and temperature of each organism studied. The counting of the colonies were expressed as Colony Forming Units per ml of sample (UFC / mL). In *Escherichia coli* O157 were transferred to the test Singlepath *E. coli* O157 colonies from the culture medium MEC Broth with Novobiocin. Regarding the presence of microorganisms studied, all showed: 100% contamination for mesophilic microorganisms, 51.47% for psychrotrophic, 98.53% for yeasts and molds, 88.24% of coliforms, 77.94% for *E. coli* and 22% for *E. coli* O157 serotype. The Curd sold in the street markets and supermarkets in the cities of Feira de Santana and Cruz das Almas, come in unsatisfactory hygienic conditions, endangering the health of consumers. The curd is an excellent culture medium, as well as the high moisture content is rich in nutrients which favors the growth of microorganisms. So the curd is easily contaminated by microorganisms throughout the production process to commercialization.

Key-Words: *Escherichia coli*, Hygiene, bacteria, fungi.

1. INTRODUÇÃO

Dentre os produtos derivados de leite, o queijo é considerado um veículo frequente de patógenos de origem alimentar e, em especial, os queijos frescos artesanais, por serem elaborados a partir do leite cru e por não sofrerem processos de maturação. A contaminação microbiológica dos produtos assume destacada relevância para a saúde pública, pelo risco de causar doenças transmitidas por alimentos (DTAs) (Feitosa et al., 2003).

Os queijos regionais brasileiros obtidos por processos artesanais têm grande possibilidade de se apresentarem contaminados, devido ao uso de matérias-primas de fontes não seguras. A elevada proporção de casos de mastite no rebanho leiteiro, ao lado das deficiências na higiene da ordenha, são as principais causas da produção de leite com elevados teores de patógenos. Contribuem também para a má qualidade desses produtos, os processos improvisados de fabricação geralmente em instalações deficientes e sem higiene; o armazenamento, transporte e exposição a altas temperaturas. No comércio varejista, a contaminação pode ocorrer por manipulação durante o retalho do produto e embalagem, ou no armazenamento em depósitos ou balcões não refrigerados (Pinto, Germano e Germano, 1996).

O queijo é um alimento com alto valor nutritivo e pode ser armazenado por um período superior ao do leite, com menos riscos de perda do produto. Representa fonte de alimento e de renda para milhares de famílias que encontram nesta atividade seu principal meio de subsistência. A produção artesanal de queijos apresenta, além das relevantes questões sociais, grande importância cultural. A extensão da fabricação em pequena escala ou caseira, pode ser superficialmente avaliada pela quantidade de queijos artesanais que se encontra a venda em feiras populares, em todo o país, quase sempre vendidos frescos (Lima, 2005).

Os microrganismos indicadores são utilizados para avaliar a qualidade microbiológica dos alimentos e também apontam riscos de contaminações de origem

fecal, a provável presença de patógenos ou deterioração potencial do alimento e indicações relevantes sobre as condições higiênico-sanitárias no processamento, na produção e no armazenamento (Cardoso e Araújo, 2004).

Dentre os possíveis patógenos encontra-se a *E. coli* O157, por serem os bovinos seu principal reservatório. Essa cepa de *E. coli* produtora de shigatoxinas é altamente patogênica e responsável por enfermidades de natureza grave, como a colite hemorrágica, a síndrome hemolítica urêmica e a púrpura trombocitopênica trombótica, que podem ser fatais, principalmente para crianças e idosos. É responsável por diversos surtos envolvendo o consumo de leite e seus derivados, é uma bactéria que não apresenta resistência ao processo de pasteurização, porém resiste ao resfriamento e ao congelamento (Oliveira, 2012).

Bactéria patogênica em alimentos é uma questão de segurança alimentar mundial. Os riscos de doenças humanas associados com produtos crus podem ser mais bem previstos por monitoramento de pontos potenciais de contaminação microbiana na área durante a coleta, durante o processamento e distribuição ou no varejo. Assim, a rápida e exata identificação de bactérias patogênicas nas amostras de alimentos são importantes, para garantia da qualidade do alimento e para localizar surtos dessas bactérias (Bhagwat, 2003).

Atualmente, o interesse na qualidade dos alimentos aumentou consideravelmente, sobretudo, no que diz respeito aos perigos associados com contaminantes e metabólitos. A qualidade microbiológica do queijo é de primordial importância, por estar relacionado à saúde pública (Fernandes, Andreatta e Oliveira, 2006).

Nesse contexto, avaliar a qualidade microbiológica dos requeijões consumidos é importante, uma vez que a ingestão desses alimentos contaminados pode causar diversas doenças transmitidas por alimentos (DTAs) para a população, sendo, portanto, um problema de saúde pública. Desse modo, o objetivo do presente estudo foi avaliar a qualidade microbiológica de requeijão do norte comercializado em feiras livres e supermercados das cidades de Feira de Santana e Cruz das Almas - Bahia, através da contagem de microrganismos mesófilos e psicrotróficos, bolores e leveduras, coliformes totais e *E. coli* e a ocorrência de *E. coli* O157.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Produção do queijo tipo Requeijão

A indústria de queijo expandiu no Brasil em relação à década passada (Sapata et al., 2008; Araújo et al., 2001a) e a elaboração de queijo constitui uma das mais importantes atividades na indústria de laticínios, sobretudo, nas regiões Sul e Sudeste do Brasil, cuja produção se concentra principalmente em indústrias de pequeno e médio porte. Sua fabricação originou-se no estado de Minas Gerais com procedimentos caseiros (Quintana e Carneiro, 2007).

Entende-se por Queijo de Manteiga ou Queijo do Sertão o produto obtido mediante coagulação do leite com emprego de ácidos orgânicos de grau alimentício, cuja massa é submetida à dessoragem, lavagem e fusão, com acréscimo exclusivamente de manteiga de garrafa ou manteiga da terra ou manteiga do sertão. A denominação "Queijo de Manteiga" ou "Queijo do Sertão" está reservada ao produto cuja base láctea não contenha gordura e/ou proteína e/ou outros produtos de origem não láctea. O Queijo de Manteiga é um queijo com teor de gordura nos sólidos totais (GST) variando entre 25% e 55%. Classifica-se quanto ao teor de umidade como Queijo de Média até Alta Umidade, devendo dessa forma, apresentar um teor máximo de umidade de 54,9% m/m (Brasil, 2003).

No Brasil, a indústria de laticínio é expressiva, sendo que, em 2008, foram produzidos 22.654.082 litros de leite, destes, 6.153.228 (27,2%) litros são produzidos no estado de Minas Gerais (Aualpec, 2009) sendo que, em 2002, foram produzidas 31.762 toneladas de queijo Minas Frescal (Barros et al., 2004) e, em 2008, houve um aumento na produção de 4,5% de queijo no Brasil (Aualpec, 2009).

Considerando que o leite é a principal matéria-prima do queijo, aumenta-se a preocupação com o produto. O leite é considerado o alimento mais complexo existente para o consumo humano, pois possui alto valor biológico, uma vez que é composto de carboidratos, proteínas, vitaminas e sais minerais. É largamente

utilizado para o preparo de derivados, os quais mantêm em sua composição praticamente todos os componentes nutritivos do leite. Para o preparo desses derivados, a matéria-prima deve ser obtida em condições higiênico-sanitárias ideais e ser resfriado logo após sua obtenção, pois os elementos contidos no leite formam um excelente substrato para o crescimento de microrganismos, afetando a qualidade do produto final (Albuquerque e Rodrigues, 2008).

A produção de queijo modifica a microbiota bacteriana do leite de modo a evitar, até certo ponto, a multiplicação de agentes de doenças (Almeida e Franco, 2003). O queijo apresenta vários pontos críticos, durante a fabricação, que podem conduzir a alterações e até recontaminação no produto final (Rosa, Porto e Spoto, 2005). Segundo Araújo et al. (2001b), o queijo é uma das formas mais antigas de conservação do leite, pois surgiu praticamente com a domesticação de animais produtores de leite. É um produto apreciado tanto pelo valor nutritivo como pelo sabor que atende aos paladares mais exigentes. Tem ampla aceitação comercial e faz parte do hábito alimentar da população, na maioria das regiões do país (Leite, Lima e Reis, 2005).

O queijo é um dos produtos mais suscetíveis a contaminações microbianas, em razão dos vários processos envolvidos na sua fabricação, como a pasteurização do leite, coagulação, corte do coágulo, dessoragem, enformagem, salga e maturação. Além disso, a contaminação cruzada durante ou após o processamento (armazenamento e transporte) pode contaminar esses alimentos (Balbani e Butugan, 2001). As contaminações, aliadas às alterações decorrentes podem, em poucos dias, tornar o queijo inaceitável ou até mesmo impróprio para o consumo (Rocha, Buriti e Saad, 2006).

O queijo é um alimento com alto valor nutritivo e pode ser armazenado por um período superior ao do leite, com menos riscos de perda do produto. Representa fonte de alimento e de renda para milhares de famílias que encontram nesta atividade seu principal meio de subsistência. A produção artesanal de queijos apresenta além das relevantes questões sociais e econômicas, grande importância cultural. A extensão da fabricação em pequena escala ou caseira, pode ser superficialmente avaliada pela quantidade de queijos artesanais ou semi artesanais que se encontra a venda em feiras populares, em todo o país, quase sempre vendidos frescos ou semi curados (Lima, 2005).

Os queijos regionais brasileiros obtidos por processos artesanais têm grande possibilidade de se apresentarem contaminados, devido ao uso de matérias-primas de fontes não seguras. A elevada proporção de casos de mastite, no rebanho leiteiro, ao lado das deficiências na higiene da ordenha, são as principais causas da produção de leite com elevados teores de patógenos e conseqüentemente a produção de queijos frescos, com elevados níveis de contaminação bacteriana. Contribuem também para a má qualidade desses produtos os processos improvisados de fabricação geralmente em instalações deficientes e sem higiene, o armazenamento, transporte e exposição a altas temperaturas. No comércio varejista a contaminação pode ocorrer por manipulação, durante o retalho do produto e embalagem, ou no armazenamento em depósitos ou balcões não refrigerados (Pinto, Germano e Germano, 1996).

Conforme Barros et al. (2004), o queijo comercializado a preços relativamente acessíveis, chegou à condição de terceiro alimento mais consumido pela população. A qualidade dos produtos lácteos incentiva a aceitação e demanda dos consumidores. A legislação brasileira exigir a utilização de leite pasteurizado no preparo é bastante frequente a comercialização do produto que não atende a esta especificação legal (Loguercio e Aleixo, 2001).

No Brasil existem vários tipos de queijos frescos produzidos de forma artesanal e industrial, tanto por pequenos produtores quanto por algumas indústrias (Salotti et al., 2006). Duarte et al., (2005) e Leite, Lima e Reis, (2005) citaram que os alimentos obtidos por processos artesanais têm grande possibilidade de se apresentarem contaminados, devido ao uso de matérias-primas de fontes não seguras, utensílios mal higienizados ou contaminados. Quando o produto é fabricado de forma artesanal, por pessoas não treinadas, pode ocorrer a contaminação por diversos microrganismos, comprometendo tanto a qualidade, como a segurança da saúde do consumidor. Por esse motivo, as práticas higiênicas devem ser observadas com rigor, para prevenir uma possível contaminação ou recontaminação do produto. Além disso, por não ser maturado, é um produto perecível, devendo ser consumido rapidamente após curta estocagem em ambiente refrigerado (Loguercio e Aleixo, 2001; Feitosa et al., 2003; Salotti et al., 2006; Rocha, Buriti e Saad, 2006).

O queijo manteiga, também conhecido como Requeijão do Norte é produzido em maior escala principalmente nos Estados de Alagoas, Sergipe, Pernambuco, Paraíba e Rio Grande do Norte. Seu processamento consiste basicamente na coagulação do leite desnatado, dessoragem da massa, acidificação e lavagem da massa com água ou leite, salga, fusão da massa com manteiga da terra, moldagem ou enformagem. O produto é geralmente apresentado em formato de paralelepípedo, entre 2,0 a 10,0 Kg. De acordo com o teor de gordura no extrato seco pode-se classificar o queijo manteiga como “semigordo” a “gordo” e, de acordo com o teor de umidade, de “média” a “alta” umidade (Nassu, Macedo e Lima, 2003).

A obtenção de massa coagulada é através de acidificação direta do leite com ácido orgânico de grau alimentício, remoção parcial do soro, lavagem com água quente ou leite quente, fusão da massa, adição exclusivamente de manteiga da terra ou manteiga de garrafa, adição de sal, transferência da massa fundida para formas, resfriamento, embalagem e estocagem refrigerada até 10°C (Brasil, 2001).

A contaminação microbiana desses produtos assume destacada relevância tanto para a indústria, pelas perdas econômicas, como para a Saúde Pública, pelo risco de causar doenças transmitidas por alimentos (DTAs) (Feitosa et al., 2003), além de comprometer suas características sensoriais bem como torná-lo impróprio para o consumo em virtude da contaminação por microrganismos (Araújo et al., 2001b).

2.2. Dentre as bactérias causadoras de contaminação nos requeijões, destaca-se a *Escherichia coli*

A bactéria *Escherichia coli* foi descrita em 1885 como uma bactéria componente da microbiota intestinal por T. Escherich, que a denominou *Bacterium coli commune*. Escherich mostrou naquela época que esse microrganismo era patogênico quando injetado em coelhos. Em 1945, Bray associou essa bactéria à diarreia infantil e a denominou por *Bacterium coli neapolitanum* (Bertão e Saridakis, 2007).

A *E. coli* faz parte do grupo dos coliformes termotolerantes que são capazes de fermentar a lactose à 44,5-45,5°C em 24 horas com produção de gás. Possui como hábitat natural o trato intestinal de animais de sangue quente, sendo por isso

considerada indicadora de contaminação fecal de alimentos (Silva et al., 2007; Franco e Landgraf, 2008).

E. coli é um membro da família Enterobacteriaceae, a qual reúne as bactérias Gram-negativas anaeróbias facultativas e oxidase negativas. Segundo Krieg e Holt (1984), as principais características que distinguem essa espécie dos demais membros da família são o metabolismo fermentativo da glicose, que se dá por fermentação ácida mista e resulta em uma quantidade significativa de diferentes ácidos como produtos finais (ácido láctico, acético e fórmico). Caracteristicamente, *E. coli* produz indol e a enzima β -glicuronidase, mas não produz sulfeto de hidrogênio e não hidrolisa a uréia. A β -glicuronidase é produzida por 96% das cepas, mas não pelos outros membros da família Enterobacteriaceae, exceto *Shigella* (44%) e *Salmonella* (29%). Um dos substratos mais utilizados para verificar a presença da β -glicuronidase é o 4- metilumbeliferil- β -D glicuronídeo (MUG), composto não fluorescente que, quando degradado pela β -glicuronidase, resulta na 4- metilumbeliferona, fluorescente sob luz ultravioleta (UV).

O gênero *Escherichia* é formado por diversas espécies, porém somente a *E. coli* é um patógeno com importância para humanos e para animais. São microrganismos Gram-negativos, bastonetes, não-esporulados, anaeróbios facultativos, catalase-positivos e oxidase-negativos pertencentes à família Enterobacteriaceae (Hirsh e Zee, 2003).

A bactéria *Escherichia coli* normalmente coloniza o trato gastrointestinal de crianças dentro de poucas horas após o nascimento. Essas linhagens comensais raramente causam doenças em hospedeiros saudáveis. No entanto, clones de *E. coli* adquiriram atributos de virulência específicos, que conferem a estas bactérias maior capacidade de se adaptar a novos nichos e dessa maneira causar um amplo espectro de doenças, dentre elas as diarréicas, as infecções do trato urinário e as meningites. Dentre as linhagens de *E. coli* intestinais, causadoras de doenças diarréicas existem seis categorias bem descritas: a enteropatogênica (EPEC), a enterotoxigênica (ETEC), a enteroinvasiva (EIEC), a enteroagregativa (EAEC), a difuso aderente (DAEC) e produtora de toxina do tipo shiga (STEC). Os patótipos de *E. coli* implicados em doenças extraintestinais são conhecidos como ExPEC, sendo exemplos deles, *E. coli* uropatogênica (UPEC) e *E. coli* associado à meningite (MNEC). Linhagens pertencentes a cada uma destas categorias

utilizam diferentes estratégias para provocar infecção, consequência da versatilidade de seu genoma que é conferida principalmente por duas configurações genéticas: plasmídeos de virulência e ilhas de patogenicidade, além da presença de bacteriófagos (Paton e Paton, 2002; Hacker, Blum-Oehler e Janke, 1999).

Atualmente há seis grupos de *E. coli* patogênicas reconhecidos:

- 1) *E. coli* enteropatogênica (EPEC),
- 2) *E. coli* enterotoxigenica (ETEC),
- 3) *E. coli* enteroinvasiva (EIEC),
- 4) *E. coli* enteroagregativa (EAaggEC ou EAEC),
- 5) *E. coli* de aderência difusa (DAEC) e
- 6) *E. coli* Shiga Toxigênica (STEC) (Desmarchelier e Grau, 1997).

A EPEC foi a primeira categoria de *E. coli* identificada como causadora de diarreia. Em 1995, foi reconhecida a existência de duas categorias de EPEC denominadas EPEC típica e EPEC atípica. As características comuns às duas categorias são a não produção de toxina Shiga (Stx) e ambas serem capazes de causar lesão A/E (*attaching and effacing*). (Trabulsi, 2005).

A doença causada por EPEC é uma gastroenterite, caracterizada por diarreia aquosa ou sanguinolenta. O mecanismo da diarreia ainda não está completamente elucidado, mas é decorrente da adesão do microrganismo ao epitélio do intestino e subsequente destruição das microvilosidades, resultando em alteração física da integridade do intestino (Padhye e Doyle, 1992).

As ETEC são patótipos de *E. coli* que produzem enterotoxinas termolábeis (LT-I e LT-II) e termoestáveis (STa e STb) (Trabulsi, 2005). A diarreia é consequência da ação de enterotoxinas produzidas por essas bactérias no intestino do indivíduo infectado (Silva et al., 2007).

Entende-se por EIEC a classe de *E. coli* que causa uma infecção intestinal muito semelhante à causada por *Shigella*. A infecção é resultante da penetração das bactérias nas células da mucosa intestinal, e consequente penetração nas células adjacentes. Há intensa proliferação dentro dessas células, que leva a sua morte. Não há produção de nenhum tipo de toxina. Como nas shigeloses, a infecção causada por EIEC consiste em inflamação e necrose da mucosa do cólon (intestino grosso). A característica invasiva, tanto da EIEC como da *Shigella*, está associada à presença de um plasmídeo (Padhye e Doyle, 1992).

Recebem a denominação *E. coli* enteroagregativa (EAEC) as amostras de *E. coli* agregadas - empilhadas e que formam um padrão agregativo de adesão, quando se associam com células HEP-2 ou HeLa. Esse tipo de bactéria causa lesões que se caracterizam por hiperplasia moderada do íleo e do ceco, edema das vilosidades do intestino delgado e deposição de camadas de bactérias agregadas, empilhadas sobre o epitélio (Trabulsi, 2005).

As STEC, também chamadas de *E. coli* enterohemorrágicas (EHEC) ou de *E. coli* verotoxigênicas (VTEC), compreendem uma classe de cepas de *E. coli* produtoras de verotoxinas, incluindo a *E. coli* O157, associada à enterocolite hemorrágica em indivíduos de todas as idades. A síndrome é decorrente da adesão às células epiteliais intestinais e à ação de citotoxinas produzidas no intestino do indivíduo infectado (Weagnt, Bryant e Jinnemn, 1995).

Almeida e Franco (2003) citam que a presença de coliformes em queijos vem se tornando cada vez mais preocupante pelo surgimento de surtos de toxinfecções alimentares por *E. coli* patogênica.

Em queijo minas frescal fabricado artesanalmente foi registrado 91,3%, 43,5% e 31,6% das amostras em desacordo com os padrões estabelecidos na legislação brasileira para *S. aureus*, *Salmonella* e *E. coli* respectivamente (Silva, 2001).

2.3. Dentre as cepas de *E. coli* existe um grupo capaz de provocar doenças em indivíduos humanos, coletivamente chamadas de *Escherichia coli* O157

E. coli enterohemorrágica (EHEC) é patogênica para os humanos e pertencem ao grupo *E. coli* shigatoxigênica (STEC) (Vicente, Amaral e Cerqueira, 2005). Ela é a maior causadora de gastroenterite que pode carrear colite hemorrágica (HC) ou a síndrome urêmica hemolítica (HUS), que é a principal causa de doença renal aguda em crianças. Desde esta identificação como um patógeno em 1982, STEC O157 tem sido considerada causador de sérias doenças, especialmente no Canadá, Japão, Inglaterra e Estados Unidos (Blanco et al., 2003, Bergamini et al., 2007). Embora mais de 200 sorotipos de *E. coli* produzam shigatoxina, o número de cepas consideradas patogênicas é crescente para o ser humano, entretanto o sorotipo O157 é o sorotipo mais

frequentemente associado com doenças alimentares (Cobbold e Desmarchelier, 2000; Vicente, Amaral e Cerqueira, 2005).

O principal fator de virulência de STEC é uma potente citotoxina denominada toxina shiga, da qual existem dois tipos: *stx1* e *stx2*. Outro fator de virulência descrito é a intimina, produto do gene *eae* (de *E. coli* attachment and effacement), uma proteína de membrana externa envolvida na adesão da bactéria aos enterócito (Nataro e Kaper, 1998).

A dose infectiva da *E. coli* O157 ainda é desconhecida. Porém, por meio da compilação de dados de surtos investigados, incluindo a habilidade do microrganismo de ser transmitido de pessoa a pessoa, estima-se que a dose infectante encontre-se na faixa de 10 células por grama ou mililitro do alimento consumido (FDA, 2009). É considerada uma das principais causas de colites enterohemorrágicas e da Síndrome Urêmica Hemolítica (SUH) (Griffin e Tauxe, 1991).

As principais características que distinguem a *E. coli* O157:H7 das demais cepas de *E. coli* são o crescimento pobre ou nulo à 44,5°C, temperatura normalmente empregada para pesquisa desse microrganismo em alimentos, e a incapacidade de utilizar o sorbitol e produzir a enzima B-glicuronidase (Franco e Landgraf, 2008).

A adaptação das células bacterianas no trato gastrointestinal de bovinos pode induzir o sistema de ácido resistência em *E. coli* patogênicas e não patogênicas. A *E. coli* O157 com sistema de ácido resistência induzido pode permanecer resistente ao ácido nos alimentos por um determinado período. Uma vez ingeridos por meio do alimento contaminado, os organismos ácido adaptados são capazes de sobreviver à defesa ácido gástrica do hospedeiro humano e colonizar o intestino através de competição com os organismos comensais. A *E. coli* O157 é considerado um dos sorotipos mais ácido resistentes (Chung, Bang e Brake, 2006), sendo capaz de sobreviver em produtos lácteos fermentados, os quais apresentam pH baixo, tais como o iogurte e leite acidificado (Govaris, Koides e Papatheodorou, 2002).

A patogenia da síndrome hemolítica urêmica (SUH) também está associada com estas toxinas que provocam danos às células endoteliais. Deste modo iniciam um mecanismo de coagulação, resultando na formação de microtrombos, os quais

poderão obstruir completa ou parcialmente alguns capilares dos rins e de outros órgãos, acarretando em um acúmulo de resíduos no sangue. Estes coágulos podem também obstruir pequenos capilares no cérebro, podendo levar à óbito o paciente (Byrnes e Moake, 1986).

Mais de quatrocentos diferentes sorotipos O:H de EHEC têm sido isolados de bovinos, o que torna seu estudo necessário e importante devido ao envolvimento direto na causa de doenças gastrintestinas humanas (Bettelheim et al 2005). No Brasil foram identificados os sorogrupos O11, O113, O114, O119, O125, O126, O128, O142, O158 e O127, com presença de genes de enterotoxinas (Rigobelo, 2006, Vicente, Amaral e Cerqueira, 2005).

E. coli O157 é o sorotipo predominante em doenças associadas às *E. coli* enterohemorrágicas e representa uma ameaça à saúde pública, uma vez que seus agravos geralmente são de natureza grave (Roldán et al., 2007). Nos últimos anos, o número de surtos notificados tem aumentado devido às mudanças na produção, processamento e distribuição dos alimentos, nos hábitos de consumo e pela utilização de métodos mais sensíveis para sua detecção. (Gomez et al., 2005).

Sorogrupos como O157:H7, O111:H8, O26:H11, O103:H2, são referidos como STEC e com a presença do gene *eae* são frequentemente relatados como altamente patogênicos (Bergamini et al., 2007).

A maioria dos surtos por *E. coli* shigatoxigênicas (STEC) está associada ao consumo de alimentos de origem bovina crus ou mal cozidos. (Gomez et al., 2005; Rivero et al., 2004; Vicente, Amaral e Cerqueira, 2005). Desde 1982, foram relatados mais de 100 surtos de STEC O157, sendo que 52% foram atribuídos ou relacionados a alimentos de carne bovina (Elder et al., 2000).

As estirpes de *E. coli* O157 e outras *E. coli* enterohemorrágicas se tornaram conhecidas como os principais agentes causadores de diarreia hemorrágica. Estas *E. coli* produzem uma ou mais shiga-toxinas (*stx*) ou vero-citotoxinas. Em sentido estrito, o termo EHEC refere-se apenas aos sorotipos que causam uma doença clínica idêntica à causada pela *E. coli* O157, não existindo consenso sobre quando é que uma *E. coli* produtora de *stx* pode ser considerada uma EHEC (Ammon, 1997).

A *E. coli* enterohemorrágica (EHEC) é também chamada de *E. coli* verotoxigênica (VTEC) ou de *E. coli* Shiga Toxigênica (STEC) por ter a capacidade

de produzir toxinas que são citotóxicas para as células Vero e por ser semelhante à toxina produzida pela *Shigella dysenteriae* (O'Brien et al., 1982).

Mais de cem sorogrupos de *E. coli* produzem essas toxinas, porém nem todas as STEC são consideradas patogênicas. Outros fatores de virulência são importantes para que ocorra a infecção e a doença (Nataro e Kaper, 1998).

A EHEC é capaz de infectar uma variedade de pessoas. Entretanto, crianças, idosos e indivíduos imunocomprometidos possuem alto risco de ter os sintomas clínicos da doença e complicações severas (Vicente, Amaral e Cerqueira, 2005).

2.4. Mecanismos de patogenicidade da *E. coli* O157

A patogenicidade de *E. coli* O157 está relacionada a três fatores de virulência: produção de enterotoxinas semelhantes as da *Shigella*, produção de hemolisina e expressão de adesinas específicas com as quais a bactéria coloniza o epitélio intestinal (Armstrong e Hollingsworth, 1996).

As enterotoxinas produzidas são chamadas verotoxinas (VTs), uma vez que a atividade biológica pode ser observada em células de cultura Vero, originárias de rim de macaco ou toxinas shiga-like (SLTs) que são imunologicamente e estruturalmente o proposto modo de ação em células de mamíferos envolve a seguinte sequência de eventos. A subunidade B da toxina liga-se a receptores glicolipídicos na célula. Após internalização, a subunidade A é enzimaticamente reduzida para um fragmento A1, o qual liga-se então a ribossomos 60S para inibir a síntese protéica e causar a morte celular (O'Brien et al., 1982).

A *E. coli* enterohemorrágica (EHEC) tem também um gene cromossomal denominado *eae*, responsável pelas alterações do citoesqueleto das células epiteliais da mucosa intestinal, com destruição das microvilosidades e acúmulo de actina no local da adesão. Verifica-se a ação nos vasos sanguíneos das microvilosidades com eliminação de sangue nas fezes (Franco e Landgraf, 2008).

A maioria das *E. coli* O157 carregam um plasmídio de 60 Mda (megadaltons). Observações conflitantes tem sido feitas por diversos autores sobre o papel do plasmídio de 60 Mda conferindo propriedades de aderência ao microrganismo. Entretanto, o processo de colonização do trato intestinal não está totalmente elucidado. Estudos têm revelado que existe um padrão de colonização bastante definido, sendo semelhante às características de fixação e destruição que ocorrem

nos casos de infecção humana por *E. coli* O157. A *E. coli* O157 coloniza difusamente o ceco, superfícies do cólon e o epitélio das criptas. As microvilosidades são destruídas e as células epiteliais são irregularmente formadas ou destacadas no local de fixação bacteriana. Alguns estudos revelam a penetração de bactérias dentro de células epiteliais. Porém, a intensiva invasão e multiplicação intracelular, como ocorre nos casos de infecção por *Shigella*, não é observada (Doyle, 1991).

Os mecanismos pelos quais EHEC causam colite hemorrágica e síndrome hemolítica e urêmica não foram totalmente elucidados. A mais importante característica de virulência, a produção de uma ou mais toxinas Shiga, isoladamente, não é suficiente para causar tais agravos, e outros fatores são considerados relevantes, como a presença do plasmídeo pO157, que codifica a enterohemolisina e a produção de adesinas fimbriais e afimbriais (Paton e Paton, 2002).

As *stxs* são produzidas pelas bactérias no cólon e chegam até os rins pela corrente sanguínea, danificando as células renais e produzindo uma oclusão da microvasculatura através da combinação da toxicidade e indução da produção local de citocinas e quimiocinas, resultando em uma inflamação local, podendo conduzir a SHU (Andreoli et al, 2002). A *stx* também induz apoptose do enterócito (Quintanilla, 2005).

As *stxs* são interiorizadas nas células humanas via endocitose, resultando em inibição da síntese protéica e morte celular. O dano às células endoteliais do rim, por meio deste processo, é provavelmente o primeiro evento etiológico na síndrome hemolítica urêmica (SHU). Esse processo pode afetar outros órgãos incluindo o cérebro, miocárdio e pâncreas, com o consequente desenvolvimento de encefalopatia, cardiomiopatia e *diabetes mellitus* (Coia, 1998).

As cepas EHEC são capazes de aderir fortemente às células epiteliais, através da produção de uma proteína superficial denominada intimina e de um receptor – Tir - que, uma vez secretado na célula hospedeira, aloja-se na membrana e serve como ponto de ancoragem para a intimina (Zhang, Chen e Wang, 2006). Esse processo provoca, na célula hospedeira, o que se chama de lesões A/E (“attaching and effacing”), causadas pela deformação de algumas microvilosidades, desestruturação de outras e formação de uma estrutura em pedestal, na qual a membrana epitelial

envolve a bactéria (Salyers e Whitt, 1994). Essa lesão é caracterizada pela degeneração localizada das microvilosidades epiteliais intestinais e a montagem de estruturas semelhantes a pedestais, constituídas de filamentos de actina, formadas nos locais onde há bactérias aderidas (Nataro e Kaper, 1998).

As cepas O157 e a maioria dos demais sorotipos da STEC isoladas de humanos apresentam um plasmídio altamente conservado, chamado pO157 (BEUTIN et al., 1994). Também relatado na literatura como plasmídio 60-MDa, esse plasmídio contém o gene *ehxA* (ou *hlyA*), que codifica uma hemolisina, chamada de enterohemolisina ou hemolisina de *E. coli* enterohemorrágica (EHEC Hly) (Rivas, Miliwebsky, 2000).

A patogenia da síndrome hemolítica urêmica (SUH) também está associada com estas toxinas que provocam danos às células endoteliais. Deste modo iniciam um mecanismo de coagulação resultando na formação de microtrombos, os quais poderão obstruir completa ou parcialmente alguns capilares dos rins e de outros órgãos, acarretando em um acúmulo de resíduos no sangue. Estes coágulos podem também obstruir pequenos capilares no cérebro, podendo levar a óbito o paciente (Byrnes e Moake, 1986).

A infecção por *E. coli* O157 em humanos apresenta manifestações clínicas que variam desde ausência de sintomas até a morte, os principais sintomas são: diarreia não sanguinolenta, colite hemorrágica (CH), síndrome hemolítica urêmica (SHU) e púrpura trombocitopênica trombótica (PTT). O período de incubação médio da doença é de três dias, podendo variar entre um e oito dias e a maioria dos pacientes com CH melhora espontaneamente após sete dias. A SHU, primeiramente descrita em 1955 na Suíça apresenta três características clínicas: anemia hemolítica microangiopática, trombocitopenia e falência renal aguda. Pode ocorrer em todas as faixas etárias, mas é mais comum em bebês e crianças e é a maior causa de falência renal na infância. A PTT pode ocorrer ou não associada aos casos de SHU. Quando associada, além dos sintomas da SHU ocorre também manifestação neurológica e febre. A prevalência é maior em crianças abaixo de cinco anos, decresce com o avanço da idade e volta a aumentar novamente em pessoas acima de 65 anos (Garcia, 2006).

A Síndrome hemolítica urêmica (SHU) é diagnosticada normalmente após seis dias do início do quadro de diarreia, sendo que 50% dos pacientes precisam fazer

diálise e 75% necessitam de transfusão sanguínea. Complicações neurológicas agudas ocorrem em 25% dos pacientes. Complicações raras incluem pancreatite, *diabetis melitus*, efusão pleural ou do pericárdio. Dos pacientes com Síndrome urêmica hemolítica (SHU), 3-5% vão a óbito (Byrnes e Moake, 1986).

2.5. Fontes de contaminação da *E. coli* O157

Os humanos normalmente se tornam infectados com STEC pela ingestão de alimento e água contaminados ou através do contato direto com os animais. Fontes de contaminação incluem carne, salsicha, leite cru, queijo, suco de maçã não pasteurizado, alface, melão, rabanete e água. A transmissão também pode ocorrer de pessoa para pessoa (Gyles, 2007).

Infecções humanas vêm sendo comumente associadas com o consumo de uma variedade de alimentos contaminados, como carnes mal cozinhas, leite cru, leite pasteurizado e água não potável (Vidal et al., 2004).

De acordo com a FDA (2009) o alimento mais implicado nos surtos documentados é o hambúrguer cru ou mal cozido, entretanto, outros surtos já envolveram brotos de alfafa, sucos de frutas não pasteurizados, salame, alface, carne de caça, e coalhada de queijo.

O bovino é considerado reservatório natural de EHEC. Por isso, a carne bovina, é o principal veículo deste patógeno. Diversos surtos de colite hemorrágica ocorridos nos Estados Unidos, Canadá, Japão, Inglaterra e Alemanha foram associados ao consumo de carne bovina, em especial ao hambúrguer, razão pela qual a síndrome provocada pela EHEC tem a denominação de “doença do hambúrguer” (Franco e Landgraf, 2008).

O gado bovino parece ser o principal reservatório de *E. coli* O157. A transmissão para humanos ocorre principalmente por meio do consumo de alimentos contaminados, assim como carnes cruas ou pouco cozidas além do leite cru. A contaminação fecal da água e outros alimentos, bem como a contaminação cruzada durante a preparação de alimentos, também pode ser responsável. *E. coli* O157 pode se abrigar nas fezes durante um período médio de 21 dias, podendo variar de 5 a 21 dias (Forsythe, 2002).

Investigações epidemiológicas demonstraram que o gado leiteiro é o reservatório primário desta cepa (Lahti et al., 2002). A contaminação fecal do leite é

uma importante via de transmissão deste patógeno aos humanos (Hancock et al., 2001). A presença de *E. coli* O157 nas fezes do gado representa um sério risco à saúde pública devido à possibilidade da transmissão direta para humanos ou da contaminação fecal de alimentos, da água e dos ambientes (Altekruse, Cohen e Swrdlon, 1997).

Em criações extensivas, como no Brasil, condições representadas por ambientes contendo fezes, efluentes de esgoto, alimentos e águas contaminados, são frequentemente aventadas como hipóteses da infecção dos animais por agentes de doença (Jardim et al., 2006). Cerqueira, Guht e Joaquim, (1999) relatam uma grande prevalência (71%) de STEC isolados de amostras de fezes de bovinos saudáveis, evidenciando que a prevalência em bovinos leiteiros foi maior que em bovinos de corte, 82% e 53% respectivamente. Tristão et al. (2007) identificaram cepas STEC em 65% dos animais analisados no Estado do Rio de Janeiro e 28% no Estado do Rio Grande do Sul, sugerindo que bovinos saudáveis podem ser potenciais fontes de infecção para humanos.

Apesar da alta prevalência de STEC, outros autores brasileiros relatam uma baixa frequência do sorotipo O157. No Estado de São Paulo, Irino et al. (2005), encontraram 0,6% de *E. coli* O157 nas fezes de bovinos leiteiros jovens. Na região de Ribeirão Preto – SP, Stella et al. (2008), isolaram *E. coli* em 430 amostras de fezes e, dessas, apenas duas foram confirmadas como O157, configurando-se como isolados de bezerros.

A *E. coli* O157 pode persistir no ambiente da fazenda, água, solo, sedimentos e carcaça de animais. Esse microrganismo tem demonstrado a capacidade de anexar, colonizar e formar biofilmes em uma variedade de superfícies. O biofilme é uma comunidade de micro organismos embebidos numa matriz polimérica produzida por eles mesmos. A fixação de bactérias, colonização e formação de biofilmes em alimentos ou em uma superfície que entre em contato com alimentos pode servir como fonte para biotransferência ou contaminação cruzada entre produtos (Uhlich, Cooke e Solomon, 2006).

Uma vigilância ativa da EHEC no homem é essencial para proteger a saúde pública. Para prevenir surtos que podem surgir da contaminação de produtos alimentares que são largamente distribuídos, as infecções por EHEC necessitam ser continuamente monitoradas (Ammon, 1997).

2.6. Além dos microrganismos patogênicos, existem os indicativos como os Coliformes totais

São comumente utilizados para verificar a qualidade higiênico-sanitária dos alimentos as contagens de coliformes que são indicadores de contaminação fecal e do risco da presença de microrganismos que podem causar toxinfecções no consumidor (Gottardi et al., 2008). Altas contagens de coliformes totais sugerem falta de higiene na ordenha do leite, uma vez que os coliformes totais são encontrados no meio ambiente e os fecais habitam exclusivamente o trato gastrointestinal de seres humanos e animais (Quintana e Carneiro, 2006).

Os grupos de coliformes totais e termotolerantes colonizam o trato intestinal de animais de sangue quente, incluindo os humanos, e têm sido empregados como indicadores de qualidade higiênica (Loguercio e Aleixo, 2001). Os coliformes fecais (termotolerantes ou a 45°C), população predominantemente constituída por *Escherichia coli* (bacilos Gram - negativos), caracterizam um grupo de microrganismos cuja presença em alimentos é indicativa de contaminação fecal. Essa contaminação, além de identificar as más condições higiênicas do produto, indica também a possibilidade de transferência de patógenos pertencentes aos grupos *E. coli* enteropatogênica clássica, *E. coli* enterotoxigênica, *E. coli* enteroinvasiva, *E. coli* enteroagregativa e *E. coli* enterohemorrágica (Pereira et al., 1999).

As bactérias do grupo coliformes são consideradas como principais agentes contaminantes associados à deterioração de queijos, causando fermentações anormais e estufamento precoce dos produtos. A presença de coliformes em queijos tem-se tornado cada vez mais preocupante pelo surgimento de surtos de toxinfecções alimentares. Os grupos de coliformes a 35°C e a 45°C colonizam o trato intestinal de animais de sangue quente, incluindo os homens e têm sido empregados como indicadores de qualidade higiênica por muitos anos. (Almeida e Franco, 2003).

Destaca-se que uma grande parte do queijo é fabricada a partir de leite cru sendo um problema na área da saúde pública, pois se constitui em um veículo para inúmeros agentes etiológicos de enfermidades zoonóticas entre eles a *E. coli* (Campos et al., 2006). Diversos relatos indicam que queijos do tipo Minas Frescal comercializados no Brasil são amplamente contaminados. Araujo et al. (1997)

observaram que 100% das amostras de queijo Minas Frescal analisadas de supermercados e padarias da cidade de Rio de Janeiro revelaram presença de coliformes a 45°C em níveis acima da portaria vigente. Oliveira et al., (1998), relataram a detecção 46,9% de coliformes a 35°C e 9,4% de coliformes a 45°C em amostras de queijo Minas Frescal nas fábricas de laticínios da região nordeste do estado de São Paulo.

Segundo Pereira et al., (1999), os coliformes representados pelos gêneros *Escherichia*, *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Serratia*, *Hafnia* e *Citrobacter*, fermentadores de lactose da família Enterobacteriaceae são frequentemente utilizados como indicadores higiênico-sanitários, em controle de qualidade de água e alimentos. Sabe-se, contudo, que o grupo coliforme não se comporta de maneira uniforme no que diz respeito à especificidade de habitat e tempo de sobrevivência em outros ambientes que não o trato intestinal.

A pesquisa de coliformes termotolerante ou de *E. coli* nos alimentos fornece, com maior segurança, informações sobre as condições higiênicas do produto e a melhor indicação da eventual presença de enteropatógenos. (Franco e Landgraf, 2008).

Os coliformes a 45°C, população predominantemente constituída por *E. coli*, caracterizam um grupo de microrganismos indicativos de contaminação de origem fecal. De acordo com normas estabelecidas pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Brasil, 2001a), a Resolução RDC nº 12 de 02 de janeiro (BRASIL, 2001a), estabelece um valor limite de acordo com a umidade do produto. Para requeijões que apresentam alto teor de umidade foi estabelecido valor aceitável mínimo de 5×10 NMP/g e máximo de 10^2 NMP/g.

A denominação coliforme fecais foi utilizada durante muitos anos para descrever coliformes que fermentavam a lactose com produção de gás a 44,5°C. *E. coli* e algumas cepas de *Klebsiella* e *Enterobacter* apresentam esta característica de termotolerância, porém somente *E. coli* tem como habitat primário o intestino humano e de animais. As *Klebsiella* e *Enterobacter* podem ser encontrados em outros ambientes, como vegetais e solo onde persistem por tempo superior ao das bactérias patogênicas de origem intestinal. Portanto, não é correta a relação direta da presença de coliformes termotolerantes em alimentos com contaminação fecal, o que levou à necessidade de modificar, na legislação

brasileira, a denominação coliforme fecais para coliformes a 45°C (Silva, Cavalli e Oliveira, 2006).

Almeida e Franco (2003) citam que a presença de coliformes em queijos vem se tornando cada vez mais preocupante, pelo surgimento de surtos de toxinfecções alimentares por *E. coli* patogênica.

2.7. Dentre os microrganismos deteriorantes, podemos citar os microrganismos Mesófilos e os Psicrotróficos

Podemos classificar as bactérias em três categorias distintas, segundo a faixa de temperatura ótima para seu crescimento: bactérias psicrófilas, mesófilas e termófilas. A faixa ótima de crescimento das psicrófilas encontra-se entre 0°C e 15°C; das mesófilas, entre 20°C e 40°C; das termófilas entre, 44°C e 55°C. Além dessas, duas outras categorias de microrganismos são importantes: as bactérias psicrotróficas e as termodúricas. As psicrotróficas, por definição, são aquelas capazes de se multiplicar em baixas temperaturas ($\leq 7^\circ\text{C}$), independente de sua temperatura ótima de crescimento. Já as termodúricas correspondem ao grupo de bactérias capazes de resistir ao processo térmico de pasteurização. (Nornberg, Tondo e Brandelli, 2009).

As determinações de bactérias mesófilas em leite cru são de grande importância uma vez que revelam as condições básicas de higiene aplicadas na obtenção do produto, revelando condições de insalubridade (Borges et al., 2001).

Elevadas quantidades de mesófilos em alimentos podem indicar que os mesmos foram preparados com matérias-primas altamente contaminadas, que o processamento foi insatisfatório do ponto de vista sanitário e ainda que os alimentos foram estocados em condições inadequadas de tempo e temperatura. Entretanto, a presença de altos níveis de bactérias mesófilas não é usada para analisar as condições sanitárias de produtos lácteos fermentados, em cujo processamento são utilizados microrganismos (Leite Junior et al., 2000).

A refrigeração do leite tem como objetivo controlar a multiplicação de aeróbios mesófilos. Estes microrganismos, em sua maioria, fermentam a lactose produzindo ácido láctico, que causa acidificação do leite comprometendo sua utilização na indústria (Fonseca e Santos, 2000). Segundo Bramley e McKinnon (1990), no leite refrigerado em temperatura menor ou igual a 4°C, a multiplicação da microbiota total

permaneceu controlada por no mínimo 24 horas, mantendo uma microbiota semelhante a do leite recém-ordenhado.

A contaminação do leite por bactérias psicrotróficas é considerada o fator mais crítico que influencia a manutenção da qualidade do leite refrigerado, sendo o gênero *Pseudomonas*, o predominante no leite armazenado a 4°C por mais de 3 dias. Microrganismos psicrotróficos estão amplamente distribuídos na natureza, podendo ser encontrados na água, no solo, nas plantas e nos animais. As bactérias psicrotróficas por si não representam o principal problema para indústria, pois são eliminadas pelo tratamento térmico, entretanto as enzimas produzidas e secretadas por estes microrganismos apresentam efeitos deteriorantes. Estas enzimas são muito estáveis ao calor e resistentes ao processo térmico convencional usado no leite. Uma ampla gama de problemas de qualidade de produtos lácteos pode estar associada à ação de proteases e lipases de origem microbiana, como alteração de sabor e odor do leite, perda de consistência na formação do coágulo para fabricação de queijo e gelatinização do leite UHT (Nornberg, Tondo e Brandelli, 2009).

Cousin et al. (2001), relacionaram que a contagem das bactérias psicrotróficas é importante para vários alimentos. Os gêneros mais encontrados são *Aeromonas*, *Alcaligenes*, *Cytophaga*, *Flavobacterium*, *Pseudomonas*, *Serratia* e *Vibrio*. Algumas bactérias são Gram positivas como *Arthrobacter*, *Bacillus*, *Clostridium* e *Micrococcus*. Dentre estas, várias são responsáveis pela diminuição da validade comercial de alimentos e consequente deterioração.

O armazenamento do leite cru sob refrigeração possibilita a redução de custos operacionais de produção e evita perdas dessa matéria-prima pela atividade acidificante de bactérias mesofílicas. Entretanto, o armazenamento por períodos prolongados e a posterior coleta e transporte do produto em caminhões-tanque isotérmicos pode resultar em queda de qualidade dos produtos lácteos, devido ao crescimento e à atividade enzimática de bactérias psicrotróficas que apresenta capacidade de coagular a proteína do leite (Nornberg, Tondo e Brandelli, 2009).

A deterioração dos alimentos por estas bactérias é favorecida em alimentos refrigerados, onde as bactérias ácidas lácticas psicrotróficas têm uma vantagem considerável na taxa de crescimento comparada com os aeróbios e anaeróbios facultativos e as bactérias gram-negativas (Sade, 2011).

A maioria dos psicrotróficos é inativada pela pasteurização e/ou processos térmicos mais drásticos, contudo, psicrotróficos formadores de esporos do gênero *Bacillus* despertam interesse considerável na pesquisa do processamento de leite, pelo fato de serem também termodúricos e resistirem a estes tratamentos (Chen, Daniel e Coolbear, 2003).

As alterações dos componentes do leite em função da multiplicação dos microrganismos psicrotróficos limitam o tempo de prateleira dos produtos lácteos devido a alterações no sabor, odor e aparência (Santos e Fonsca, 2001), pela produção de proteases e lipases termorresistentes, que podem continuar atuando nos derivados lácteos mesmo após a pasteurização rápida (HTST) ou processamento a ultra-alta temperatura (UHT) (Minguel, Teodoro e Ahashiro, 2007).

As lipases produzidas por psicrotróficos podem causar defeitos sensoriais em sorvetes, manteiga, creme de leite pasteurizado, leite em pó, queijos e produtos ultra-alta temperatura (UHT). A lipólise acarreta a formação de sabores desagradáveis em produtos lácteos devido à hidrólise dos triacilglicerídeos do leite. Após a hidrólise, ácidos graxos de cadeia curta livres, como o ácido butírico, ácido capríco e ácido caprílico conferem gosto forte e picante, já os ácidos graxos de cadeia média, como o ácido cáprico e ácido láurico têm maior participação na formação de “sabor de sabão” (Chen, Daniel e Coolbear, 2003).

No entanto, a refrigeração em torno de 4°C permite o crescimento de microrganismos psicrotróficos, que se multiplicam bem nessas temperaturas independentemente de sua temperatura ótima de crescimento. A contaminação do leite por microrganismos psicrotróficos, é um dos pontos mais importante na determinação da qualidade, não estando sua frequência diretamente relacionada às condições de higiene na produção (Bramley e Mckinnon, 1990).

Os psicrotróficos encontrados no leite são ambientais, provenientes do solo, água, vegetação, teto/úbere e de equipamentos de ordenha higienizados inadequadamente. São na maioria microrganismos Gram negativos, sendo o gênero *Pseudomonas* o mais frequente. Microrganismos psicrotróficos Gram positivos são encontrados em menor frequência, como os gêneros *Micrococcus*, *Bacillus* e *Arthrobacter* (Cousin, 1982; APHA, 1998).

Conforme Bramley e McKinnon (1990), equipamentos higienizados inadequadamente foram a principal fonte de psicrotróficos Gram negativos, variando

entre 10% e 50% da microbiota total inicial do leite cru. Thomas e Thomas (1973), consideram que o leite produzido em condições sanitárias inadequadas pode apresentar uma frequência de microrganismos psicotróficos superior a 75% da microbiota total. Segundo o Regulamento de Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal (BRASIL-RIISPOA, 1980), o leite deve apresentar no máximo 10% de microrganismos psicotróficos, em relação a contagem total de aeróbios mesófilos.

2.8. Os Fungos filamentosos (bolors) e Leveduras também são microrganismos deteriorantes

Os fungos são microrganismos ubíquos, encontrando-se em vegetais, animais, no homem, em detritos e em abundância no solo. A sua dispersão é realizada pelos animais, homem, insetos, água e, principalmente, pelo ar atmosférico, através dos ventos. São seres eucarióticos com um só núcleo, como as leveduras ou multinucleados, como os filamentosos ou bolors. São heterótrofos e nutrem-se de matéria orgânica em decomposição (fungos saprófitas) ou viva (fungos parasitários) (Trabulsi et al., 1999).

Os fungos saprófitas geralmente não são patogênicos, mas podem atuar como patógenos oportunistas, ou seja, quando o hospedeiro apresenta algum tipo de debilitação, esses organismos podem multiplicar-se e causar doenças muitas vezes com conseqüências fatais (Kern e Blevis, 1999).

Os fungos são microrganismos comuns na natureza, estando presentes em ambientes aquáticos, terrestres e no ar. O desenvolvimento destes microrganismos pode determinar doenças infecciosas ou tóxicas, em vegetais e animais, incluindo o homem. A simples presença do fungo não é fator determinante de doença, a qual depende da relação parasita/hospedeiro (Lacaz et al., 2002).

Atualmente o estudo das micoses nos animais e no homem adquire uma importância cada vez maior devido ao fato de que muitas espécies de leveduras, fungos leveduriformes e filamentosos, anteriormente consideradas não-patogênicas, têm atuado como agentes oportunistas, causando enfermidades nos hospedeiros. Em geral, as leveduras são consideradas sapróbicas e têm sido isoladas de tanques de armazenamento de leite oriundo de animais sadios. No entanto, em alguns casos,

elas também estão presentes em amostras de leite provenientes de animais com mastite (Spanaberg et al., 2009).

Os reservatórios habituais dos fungos que infectam o homem e o animal podem ser o próprio homem e o animal, ou um sítio na natureza, onde o fungo se desenvolve como saprófita. As micoses são classificadas como: (1) micoses superficiais, que se localizam nas camadas mais superficiais da pele ou dos pelos e desencadeiam uma resposta inflamatória, (2) micoses cutâneas, as quais se localizam na pele, pelo ou unhas e mucosas em maior extensão, (3) micoses subcutâneas, encontradas na pele e tecidos subcutâneos, (4) micoses sistêmicas, que atingem os órgãos internos e vísceras, podendo abranger muitos tecidos e órgãos diferentes (Trabulsi et al., 1999).

Fungos alteram alimentos, pois produzem enzimas que hidrolizam proteínas, lipídeos e carboidratos, dando origem a uma série de produtos dessa degradação, que promovem modificação na coloração, aparência desagradável, perda de sabor e também produção de metabólitos tóxicos, conhecidos como micotoxinas, tornando-os impróprios para o consumo (Franco e Landgraf, 1996).

Quando os produtos têm um alto teor de água e são armazenados sob alta umidade, eles tendem a se deteriorar pela ação de bactérias e leveduras. A deterioração por bolores ocorre mais facilmente quando a superfície do produto se torna seca ou quando este é armazenado sob condições que não favorecem o crescimento de bactérias ou leveduras (Jay, 2005).

O leite e seus derivados contaminados com microrganismos podem constituir potenciais vias de transmissão de zoonoses a eles relacionadas. Os fungos são microrganismos comuns na natureza, estando presentes em ambientes aquáticos, terrestres e no ar. O desenvolvimento destes microrganismos pode determinar doenças infecciosas ou tóxicas, em vegetais e animais, incluindo o homem. A simples presença do fungo não é fator determinante de doença, a qual depende da relação parasita/hospedeiro (Lacaz et al., 2002).

A contaminação do leite por microrganismos indesejáveis, como os fungos, pode causar alterações físico-químicas no mesmo, limitando sua durabilidade e de seus derivados, além de determinar problemas econômicos e de saúde pública (Andrade, 2001).

O tratamento térmico do leite (pasteurização ou fervura) permite a redução da ocorrência de doenças causadas por microrganismos veiculadas pelo leite e seus derivados. Entretanto, torna-se importante atentar para o risco que constitui a presença de fungos no leite, principalmente considerando-se que, em diversas localidades, é comum o hábito do consumo de leite e produtos lácteos crus. O leite cru muitas vezes é comercializado nas periferias das cidades, constituindo o chamado “leite informal ou clandestino”, não submetido a qualquer tipo de tratamento para redução de sua carga microbiana e eliminação dos principais patógenos (Melville et al ,2006).

A presença de fungos filamentosos (bolores) e leveduras viáveis em número elevado podem indicar deficientes condições higiênicas de equipamentos, falhas no processamento e/ou armazenamento, além de matéria prima excessivamente contaminada. Na legislação brasileira não possuem limites de bolores e leveduras para os queijos minas frescal, coalho, colonial, tipo minas e requeijão marajoara (Lourenço e Sousa, 2005).

2.9. Saúde pública

Microrganismos indicadores vêm sendo utilizados na avaliação da qualidade da água há longo tempo, e mais recentemente na de alimentos, devido às dificuldades encontradas na detecção de microrganismos patogênicos, como *Salmonella Typhi*. Atualmente, ao invés de enumerar os coliformes fecais e *E. coli*, alguns laboratórios estão preferindo enumerar as bactérias pertencentes a família *Enterobacteriaceae* como um todo, isto é, as fermentadoras e não fermentadoras da lactose (Franco e Landgraf, 2005).

As enfermidades transmitidas por alimentos (ETAs), especialmente as salmoneloses, constituem séria preocupação para a saúde pública. Mesmo em países do primeiro mundo, com bom sistema de vigilância sanitária, tem-se observado aumento significativo na incidência das mesmas, às vezes atingindo níveis alarmantes. Existe um grande número de bactérias responsáveis por infecções entéricas graves adquiridas através de alimentos contaminados, mas a *Salmonella spp.* tem sido o principal agente etiológico dessas enfermidades, sendo a salmonelose considerada mais que uma doença de origem alimentar ou zoonose, e sim uma geonose (Jackson, Landford e Archer, 1991).

Os indicadores de qualidade microbiológica são microrganismos degradadores e os aumentos de suas contagens resultam em perda da qualidade do produto. Quando a qualidade de um produto é significativamente afetada pela presença de certos metabólitos, podem-se utilizar esses metabólitos como indicadores de qualidade (Jay, 2005).

Atualmente, o consumo de alimentos sadios e sem risco para a população tem sido questão de grande importância, tanto para fabricantes como para as autoridades responsáveis pela fiscalização, pelo fato de alimentos contaminados representarem perdas econômicas para as empresas e colocarem em risco a saúde da população (Rêgo et al, 2001).

Na produção de alimentos, é essencial que medidas apropriadas sejam tomadas para garantir a segurança alimentar e a estabilidade do produto durante toda a sua vida de prateleira. A contaminação microbiana dos alimentos pode ocorrer em todas as etapas de processamento de um alimento, desde a obtenção de sua matéria-prima bruta até o preparo e armazenamento, passando pelo processamento na indústria (Silva, Junqueira e Silveira, 1997).

De acordo com os Padrões Microbiológicos vigentes, da Resolução Colegiada (RDC) nº 12 (Brasil, 2001b) os queijos de muito alta umidade (>55%), elaborado por coagulação enzimática e sem a ação de bactérias lácticas, deve apresentar as seguintes tolerâncias para amostras representativas: 5×10^2 UFC (Unidade Formadoras de Colônias) de coliformes de origem fecal/g, 5×10^2 UFC de estafilococos coagulase positiva/g, e ainda ausência de *Salmonella* sp e *Listeria monocytogenes* em 25g.

A qualidade higiênica é representada pela ausência de agentes físicos, químicos ou biológicos resultantes da manipulação deficiente da matéria-prima ou dos produtos derivados dela. A inocuidade dos alimentos é muito importante, pois afeta tanto a economia como a saúde pública (Coelho, 2006).

As análises microbiológicas de alimentos são importantes para deixar a população informada quanto ao nível sanitário principalmente do leite e seus derivados, bem como esclarecer os problemas à Saúde Pública oriundos do consumo de produtos de origem animal sem prévia Inspeção Sanitária (Cavalcante, 2001).

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Obtenção das Amostras

Foram coletadas 68 amostras de requeijão, comercializadas em feiras livres (31 amostras) e em supermercados (37 amostras) nas cidades de Feira de Santana e Cruz das Almas-Bahia, no período de fevereiro a junho de 2014. As amostras foram coletadas em condições assépticas e transportadas em recipiente isotérmico contendo gelo reciclável e mantidas sob refrigeração até o momento das análises microbiológicas, realizadas no laboratório de Microbiologia e Parasitologia Animal da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia - UFRB, para a realização das análises microbiológicas (Figura1).



Figura 1 - Requeijão vendido em feiras livres.

Fonte: <http://brasilimperdivel.tur.br/queijo-de-manteiga>

3.2. Análises Microbiológicas

As análises microbiológicas foram realizadas de acordo com a recomendação e exigências da RDC nº 12 de 2 janeiro de 2001 (Brasil, 2001). A metodologia para efetuar as análises foi baseada na Instrução Normativa n. 62, de 26 de agosto de 2003 do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), que oficializa

os métodos analíticos oficiais para análises microbiológicas para controle de produtos de origem animal e água (Brasil, 2003).

Foram realizadas as seguintes análises microbiológicas: contagem de coliformes totais e *E. coli*, microrganismos mesófilos e psicotróficos, bolores e leveduras e confirmação para presença de *E. coli* O157.

No momento das análises, foi removido assepticamente aproximadamente 1cm de espessura de toda parte externa de cada requeijão. Destes, 25 gramas de cada amostra foi colocado em vasos esterilizados contendo 225mL da água peptonada a 0,1%. As amostras foram homogeneizadas e diluições decimais 10^{-2} , 10^{-4} e 10^{-6} foram utilizadas para a contagem de coliformes termotolerantes e *E. coli.*, 10^{-7} e 10^{-9} para microrganismos mesófilos, 10^{-1} e 10^{-2} para microrganismos psicotróficos e 10^{-6} e 10^{-8} para bolores e leveduras.

3.3. Contagem de Microrganismos Mesófilos Aeróbios Estritos e Facultativos Viáveis

Para a contagem de microrganismos mesófilos aeróbios estritos e facultativos viáveis foram pesados 25g da amostra e adicionados 225 mL de solução salina peptonada 0,1%, homogeneizados e foram efetuadas as diluições seriadas (10^{-1} a 10^{-9}) empregando-se como solução diluidora 9 mL de salina peptonada a 0,1%, para obter as diluições (10^{-7} e 10^{-9}), onde foi transferido 1mL de cada diluição da amostra para uma placa de Petri esterilizada e 25 mL do meio de cultura Ágar Contagem Padrão (PCA), previamente fundido e aquecido a 43-45 °C, foi vertido, em cada placa. Após a homogeneização e solidificação, as placas foram incubadas em estufa a uma temperatura de 35 à 37 °C em uma posição invertida durante 48 horas. Posteriormente, foram selecionadas as placas que continham entre 1 a 300 colônias. A contagem das colônias, pela técnica *pour plate*, foi realizada com o auxílio de um contador de colônias e a média do número de colônias contadas nas placas foram multiplicadas pelo fator de diluição correspondente e o resultado expresso em Unidades Formadora de Colônia por mL de amostra (UFC/mL) (Figura 2), (APHA, 1998).



Figura 2 - Placa de Petri contendo colônias de microrganismos mesófilos em Agar Contagem Padrão (PCA).

3.4. Contagem de Microrganismos Psicrotróficos Aeróbios Estritos e Facultativos Viáveis

Para a contagem de microrganismos psicrotróficos aeróbios estritos e facultativos viáveis foram pesados 25g da amostra e adicionados 225 mL de solução salina peptonada a 0,1%, homogeneizados e foram efetuadas as diluições seriadas (10^{-1} a 10^{-2}) empregando-se como solução diluidora 9 mL de salina peptonada a 0,1%, onde foi transferido 1mL de cada diluição da amostra para uma placa de Petri esterilizada e 25 mL do meio de cultura Ágar Contagem Padrão (PCA), previamente fundido e aquecido a 43-45 °C, foi vertido, em cada placa. Após a homogeneização e solidificação, as placas foram incubadas na geladeira de cultura a uma temperatura de 6 °C em uma posição invertida durante 48 horas. Posteriormente, foram selecionadas as placas que continham entre 1 a 300 colônias. A contagem das colônias, pela técnica *pour plate*, foram realizadas com o auxílio de um contador de colônias e a média do número de colônias contadas nas placas foram multiplicadas pelo fator de diluição correspondente e o resultado expresso em unidades formadora de colônia por mL de amostra (UFC/mL) (Figura 3), (APHA, 1998).



Figura 3 - Placa de Petri contendo colônias de microrganismos psicotróficos em Agar Contagem Padrão (PCA).

3.5. Contagem de Fungos Filamentosos (Bolors) e Leveduras.

Para a contagem de fungos filamentosos (bolors) e leveduras foram pesados 25g da amostra e adicionados 225 mL de solução salina peptonada 0,1%, homogeneizados e foram efetuadas as diluições seriadas (10^{-1} a 10^{-8}) empregando-se como solução diluidora 9 mL de salina peptonada a 0,1% , para obter as diluições (10^{-6} e 10^{-8}), onde foi transferido 1ml de cada diluição da amostra para uma placa de Petri esterilizada contendo 25 mL do meio de cultura Agar Sabouraud Dextrose solidificada. Após a inoculação as amostras foram espalhadas com uma alça de drigalski sobre toda superfície do meio de cultura. Após esta etapa, as placas foram incubadas em estufa incubadora tipo B.O.D. a 24°C durante o período de 48-72 horas. Posteriormente, foram selecionadas as placas que continham entre 1 a 150 colônias. A contagem das colônias, pela técnica *spread plate*, foram realizadas e a média do número de colônias contadas nas placas foram multiplicadas pelo fator de diluição correspondente e o resultado expresso e Unidades Formadora de Colônia por mL de amostra (UFC/mL) (Figura 4), (APHA, 1998).

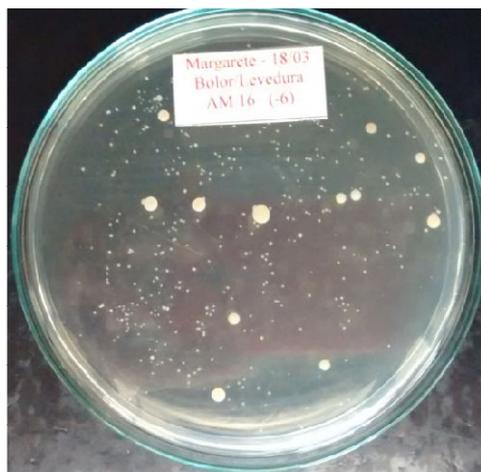


Figura 4 - Placa de Petri contendo fungos crescidos em Agar Sabouraud Dextrose.

3.6. Contagem de Coliformes totais e *E. coli*

Para a contagem de coliformes totais e *E. coli* foram pesados 25g da amostra e adicionados 225 mL de solução salina peptonada a 0,1%, homogeneizados e foram efetuadas as diluições seriadas (10^{-1} a 10^{-6}) empregando-se como solução diluidora 9 mL de salina peptonada a 0,1%, para obter as diluições (10^{-2} , 10^{-4} e 10^{-6}), onde foi transferido 1mL de cada diluição da amostra para uma placa de Petri esterilizada. A contagem foi realizada em meio de cultura Chromocult Coliformes Agar, pela técnica *pour plate*. As placas foram incubadas em estufa a uma temperatura de 35-37 °C em uma posição invertida durante 24 horas. Posteriormente, foram selecionadas as placas que continham entre 1 a 300 colônias. A detecção simultânea de coliformes e *E. coli* foi efetuado usando uma combinação de dois tipos de substratos cromogênicos. O salmão substrato β -D-GAL é clivada pela enzima β -D-galactosidase, característico de outros coliformes, resultando em colônias com coloração salmão para vermelha. O substrato X- β -D-glucuronido é clivada através da enzima β -D-glucuronidase, característico de *E. coli*, resultando em colônias de coloração azul escuro para violeta (ISO 7218:1996 / Emenda 1:2001) (Figura 5). A identificação de *E. coli* O157 foi realizado por meio do Teste rápido imunocromatográfico para detecção *E. coli* O157 (SINGLEPATH *E. COLI* O157 EMB. C/25 TESTES Merck TM) (APHA, 1978).

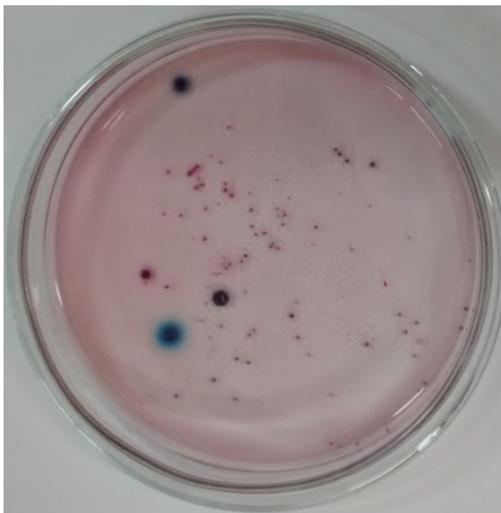


Figura 5 - Placa de Petri contendo colônias de coliformes totais e *E. coli* em Chromocult Coliformes Agar.

3.7. Propagação e Manutenção das colônias.

Foi retirada uma colônia das placas contendo colônias de *E. coli* proveniente da cultura do meio Chromocult Coliformes Agar, por meio de uma alça de Níquel, a qual foi inoculada em tubo de ensaios contendo 2mL do meio de cultura Caldo Infusão Cérebro Coração (BHI) para a propagação da mesma. Após a inoculação e incubação em estufa a uma temperatura de 35 - 37 °C durante 48 horas foi realizada a estriagem, pela técnica do esgotamento, utilizando uma alça de Níquel em placas de petri contendo meio de cultura Agar Nutriente para a conservação e manutenção das mesmas. As culturas foram mantidas em geladeira durante o período de 2 meses. Após este período, ocorreu a exaustão de nutrientes, sendo realizada a transferência das colônias para novas placas de Petri contendo o meio de cultura Agar Nutriente. Esse procedimento foi repetido até que toda coleta fosse concluída.

3.8. Enriquecimento Seletivo de *E. coli* Enterohemorrágica (EHEC) das colônias.

As placas contendo Agar Nutriente com culturas de *E. coli* proveniente do BHI, foram inoculadas em caldo de cultura MEC Broth com Novobiocina (MERCK), um meio de cultura rico em nutrientes que proporciona condições favoráveis de crescimento, aumentando a proliferação de bactérias lactose-positiva, onde a

mistura de sais biliares e novobiocina suprime o crescimento da flora microbiana Gram positiva. Após a inoculação e incubação em estufa a uma temperatura de 35 - 37 °C durante 24 horas, as amostras foram submetidas ao teste rápido imunocromatográfico para confirmação de *E. coli* O157 (APHA, 1978).

3.9. Teste para detecção de *Escherichia coli* O157

Colônias proveniente do meio de cultura MEC Broth com Novobiocina foram transferidas para o teste Singlepath *E. coli* O157. É um teste rápido imunocromático para detecção rápida de *E. coli* O157. Este dispositivo de teste tem: um ponto de amostragem circular; tem na forma oval, a zona de teste (T) e a zona de controle (C). Ao colocar uma gota da cultura proveniente do MEC Broth com Novobiocina, o ensaio poderá estar funcionando corretamente se uma linha vermelha distinta aparece na zona de controle (C) dentro de 20 minutos. A amostra será considerada positiva para a confirmação de *E. coli* O157 se antes de 20 minutos as linhas vermelhas aparecerem em ambas zonas, na zona de teste (T) e na zona de controle (C). A amostra pode ser considerada negativa se nenhuma linha vermelha aparecer na zona de teste (T) e nem aparecer nitidamente na zona de controle (C) durante 20 minutos após a aplicação da amostra no dispositivo – figuras 6,7 e 8.



Figura 6 - Teste Singlepath *E. coli* O157 estéreo.

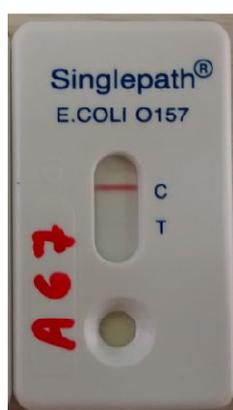


Figura 7 - Teste Singlepath *E. coli* O157 negativo para *E. coli* O157.



Figura 8 - Teste Singlepath *E. coli* O157 com confirmação positiva para *E. coli* O157.

3.10. Análise Estatística

Os dados microbiológicos foram convertidos para logaritmo (log.UFC/g). Foram realizadas através das distribuições absolutas e percentuais para as variáveis nominais e as medidas estatísticas: valor mínimo, valor máximo, média aritmética, variância, coeficiente de variação, utilizou-se a análise de variância, o teste de média (teste de Tukey), tendo como objetivo verificar se houve diferença significativa na detecção dos microrganismos, nos diferentes locais de coletas.

As contaminações tanto nas feiras livres quanto nos supermercados, das cidades de Faria de Santana e Cruz das Almas, na análise de variância para os microrganismos mesófilos, psicotróficos e os fungos bolores e leveduras apresentaram valores semelhantes. Segundo as tabelas 1, 2 e 3, pode-se afirmar com 99% de confiança que as médias não diferem estatisticamente entre si ($p < 0,01$), onde demonstra a rejeição de H_1 , ao nível de significância de 1%.

Mesmo tendo significância de 1%, foi aplicado o teste de Tukey comparando as médias entre os tratamentos, observando que os valores absolutos das amostras apresentaram a mesma letra.

Tabela 1 – Análise de Variância dos valores absolutos das concentrações de Microrganismos Mesófilos.

Fator de Variação	GL	F (calculado)	F (tabelado)
Tratamentos	3	0,005**	2,68 (5%) e 3,95(1%)
Resíduos	62		
Total	65		

$P < 0,01$: os resultados das amostras das feiras livres e supermercados das duas cidades não diferiram estatisticamente entre si.

GL – Graus de liberdade.

Tabela 2 – Análise de Variância dos valores absolutos das concentrações de Microrganismos Psicotróficos.

Fator de Variação	GL	F (calculado)	F (tabelado)
Tratamentos	3	0,012**	2,68 (5%) e 3,95(1%)
Resíduos	62		
Total	65		

$P < 0,01$: os resultados das amostras das feiras livres e supermercados das duas cidades não diferiram estatisticamente entre si, o que permite a aceitação de H_0 .

GL – Graus de liberdade.

Tabela 3 – Análise de Variância dos valores absolutos das concentrações de Bolores e Leveduras.

Fator de Variação	GL	F (calculado)	F (tabelado)
Tratamentos	3	0,007**	2,68 (5%) e 3,95(1%)
Resíduos	62		
Total	65		

P<0,01: os resultados das amostras das feiras livres e supermercados das duas cidades não diferiram estatisticamente entre si, o que permite a aceitação de H_0 .

GL – Graus de liberdade.

Quando foi comparado o índice de contaminação dos requeijões comercializados verificou-se que, em relação à contagem de coliformes totais e *E. coli*, não houve diferença estatística ($P<0,01$) entre as duas cidades e nem entre as amostras que além da análise de variância também foi aplicado o teste de Tukey onde todos os valores apresentaram a mesma letra. A cidade de Feria de Santana apresentou maior média aritmética (5,86 log.UFC/g) na contagem de coliformes em feiras livres em relação a média encontrada nas feiras livres da cidade de Cruz das Almas.

Com os valores observados na tabela 4, houve diferença no valor do Coeficiente de variação (CV) entre as cidades analisadas para os coliformes totais. A cidade de Feria de Santana (FSA – FL) apresentou Coeficiente de variação (CV) de 35,32%, seguido pelo valor de 16,89% para (FSA-S), em Cruz das Almas (CA-FL) o Coeficiente de variação (CV) foi 25,34% e 11,15% e para (CA-S). Assim, os requeijões coletados nos supermercados de Cruz das Almas (CA-S) apresentaram valores mais homogêneos em relação às amostras adquiridas nos outros locais de coletas analisadas. Porém, analisando pelo desvio padrão (S), as amostras coletadas em supermercados da cidade de Cruz das Almas (CA-S) apresentou o menor valor de 0,60 demonstrando que as mesmas não apresentaram valores muito diferentes entre si.

Embora para *E.coli*, os valores encontrados para feiras livres em Feira de Santana (FSA-FL) tenha apresentado o menor valor do Coeficiente de variação (CV) de 21,90%, as amostras das feiras livres de cidade de Cruz das Almas apresentaram o menor valor de desvio padrão (S) 0,66, sendo suas amostras mais homogêneas em relação aos outros locais de coleta analisados.

Tabela 4 – Resultados do desvio padrão e coeficiente de variação dos Coliformes totais e *E. coli* analisadas nas cidades de Feria de Santana e Cruz das Almas.

Microrganismos log.UFC/g	Desvio Padrão (S)	Coeficiente de Variação (CV)
Coliformes totais (FSA – FL)	2,07	35,32 %
Coliformes totais (FSA – S)	1,28	16,89 %
Coliformes totais (CA – FL)	1,30	25,34 %
Coliformes totais (CA – S)	0,60	11,15 %
<i>E. coli</i> (FSA – FL)	0,96	21,90 %
<i>E. coli</i> (FSA – S)	1,18	46,64 %
<i>E. coli</i> (CA – FL)	0,66	27,73 %
<i>E. coli</i> (CA – S)	1,50	51,37 %

FSA – Feira de Santana
FL – Feiras livres
S – Supermercados
CA – Cruz das Almas

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

As avaliações microbiológicas dos requeijões constaram de contagens de microrganismos indicadores de coliformes totais e *E. coli*, deteriorantes como os microrganismos mesófilos, psicrotróficos e bolores e leveduras, e patogênicos como a *E. coli* O157, estão apresentados nos gráficos 1 à 5 e na tabela 5 e 6.

Em relação à presença dos microrganismos estudados, todas apresentaram: 100% de contaminação para microrganismos mesófilos, 51,47% para psicrotróficos, 98,53% para bolores e leveduras, 88,24% para coliformes totais, 77,94% para *E. coli* e 22% para o sorotipo *E. coli* O157.

A ingestão de requeijão com condições inadequadas para consumo pode levar a graves consequências para a população, sendo, portanto, um problema de Saúde Pública. Segundo a Resolução RDC n° 12, o limite mínimo será o lote aceitável do produto e o limite máximo separa o produto aceitável do inaceitável. Assim valores intermediários entre o limite mínimo e máximo são produtos de qualidade intermediária aceitável, onde a empresa precisa analisar a higiene de processamento dos produtos (Brasil, 2001a).

Os requeijões analisados das duas cidades apresentaram contagens de bactérias mesófilas entre 4,32 log. UFC/g e 13,05 log.UFC/g (Gráfico1). As amostras de requeijões adquiridas para análise estavam todas expostas sobre bancadas nas feiras livres e em supermercados, sem condições adequadas de higiene o que pode ter provocado a suposta contaminação.

Os valores de contagens de bactérias mesófilas encontrados neste experimento, apenas duas amostras 4,32 log.UFC/g e 4,97logUFC/g estão dentro dos limites exigidos pela ANVISA, conforme Resolução RDC n° 12 de 02 de janeiro de 2001, por apresentarem quantidades de microrganismos mesófilos até 5 log.UFC/g (Brasil, 2001a).

Elevadas quantidades de mesófilos em alimentos podem indicar que os mesmos foram preparados com matérias-primas altamente contaminadas, que o

processamento foi insatisfatório do ponto de vista sanitário e ainda que os alimentos foram estocados em condições inadequadas de tempo e temperatura. Entretanto, a presença de altos níveis de bactérias mesófilas não é usada para analisar as condições sanitárias de produtos lácteos fermentados, em cujo processamento são utilizados microrganismos (Leite Junior et al., 2000).

Em comparação aos valores dos microrganismos mesófilos, os psicotróficos apresentaram valores baixos de 1 log.UFC/g à 4,62 log.UFC/g (Gráfico 2). Das amostras analisadas da cidade de Cruz das Almas, apenas uma amostra apresentou contaminação de 1 log.UFC/g. Já a cidade de Feira de Santana apresentou 55,7% das amostras com a presença da bactéria em questão. A legislação brasileira não prevê limites de microrganismos psicotróficos em produtos lácteos. A contaminação microbiológica, causada por falhas no processamento e/ ou armazenamento, pode causar defeitos no produto, associados às suas características organolépticas (sabor, aroma, cor e textura) (Aquarone et al., 2001). Microrganismos psicotróficos têm um grande potencial deteriorador e alteram os alimentos por produzirem enzimas que hidrolisam proteínas, lipídeos e carboidratos, dando origem a uma série de metabólitos, que promovem modificações nas características organolépticas dos produtos tornando-os impróprios para consumo (Frasier e Westhoff, 1993).

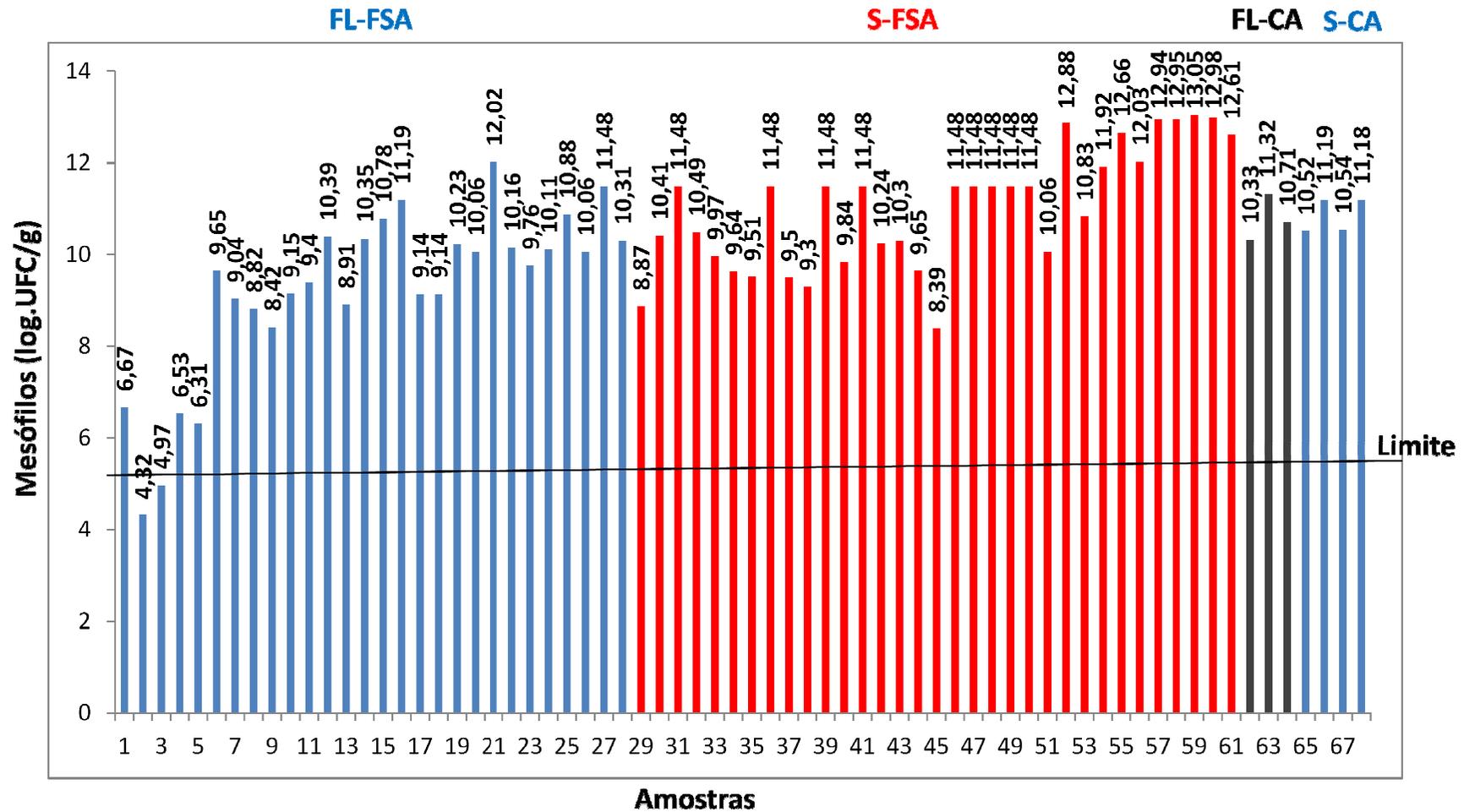


Gráfico 1 – Valores das concentrações de microrganismos mesófilos obtidas nas amostras de requeijão do Município de Feira de Santana e Cruz das Almas – BA. Fevereiro a junho de 2014.
 Log.UFC/g - Logaritmo vezes Unidade Formadora de Colônias por grama.
 FL - Feira livre, S – Supermercado, FSA – Feira de Santana, CA – Cruz das Almas, AMT – Amostra.

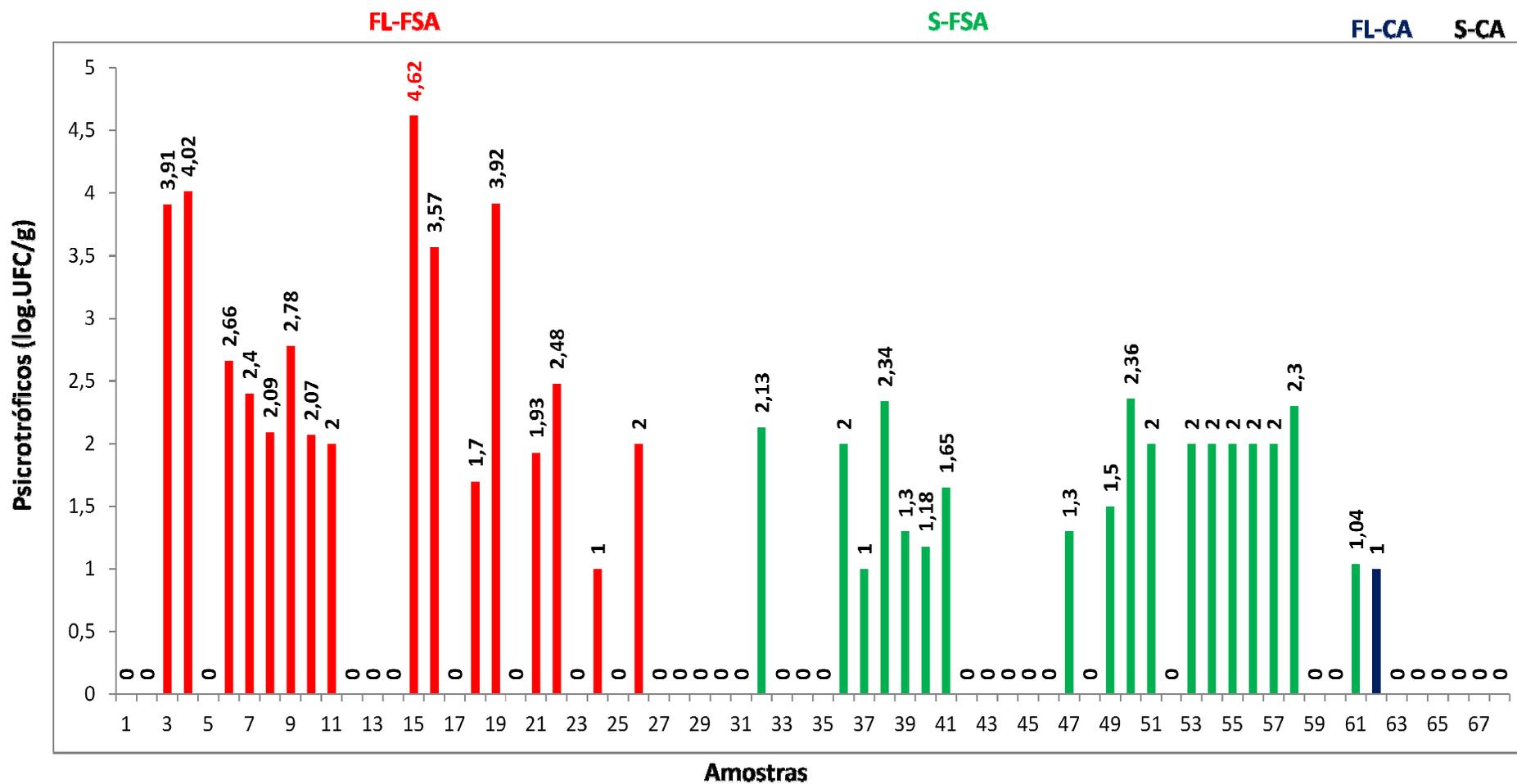


Gráfico 2 – Valores das concentrações de microrganismos psicrotróficos obtidas nas amostras de requeijão do Município de Feira de Santana e Cruz das Almas – BA. Fevereiro a junho de 2014.

Log.UFC/g - Logarítmo vezes Unidade Formadora de Colônias por grama.

FL - Feira livre, S – Supermercado, FSA – Feira de Santana, CA – Cruz das Almas, AMT – Amostra.

No gráfico 3 consta os resultados de bolores e leveduras das 68 amostras. A presença de bolores e leveduras foram observadas nos requeijões analisados com exceção da AMT 17 que não apresentou contaminação. As demais amostras apresentaram-se fora do padrão de tolerância admissível pela RDC nº 12 de 02 de janeiro de 2001, que é de 2 log.UFC/g. Segundo Lourenço e Sousa, 2002, análises realizada em amostras de requeijão marajoara produzido com leite de búfala e de vaca encontrou-se para este mesmo microrganismo um resultado de >3 log.UFC/g.

As amostras de requeijão da cidade de Feira de Santana apresentaram valores entre 4,23 log.UFC/g à 11,88 log.UFC/g e em Cruz das Almas valores entre 8,27 log.UFC/g à 9,41 log.UFC/g. Esses valores de bolores e leveduras encontrados no requeijão oferecem riscos ao produto e a saúde do consumidor, pois estão com valores acima do estabelecidos pela legislação. Durante o manuseio na fase final de processamento e na estocagem pode ocorrer a recontaminação do requeijão. Alguns bolores são psicrotróficos e seus esporos sobrevivem e germinam em condições favoráveis. Temperaturas de refrigeração inibem o desenvolvimento de bolores, mas não são capazes de destruí-los e também a anaerobiose, ou seja, uma atmosfera desprovida de oxigênio pode melhorar a conservação do produto. Os tratamentos de prevenção visando reduzir as fontes de contaminação estão relacionados com as medidas de higiene, que tendem limitar o desenvolvimento de bolores e leveduras. Recomenda-se uma higiene rigorosa das embalagens, bem como dos locais de fabricação, armazenamento e comercialização para evitar o crescimento de tais contaminantes. (Moreno, Vialta e Valle, 2002).

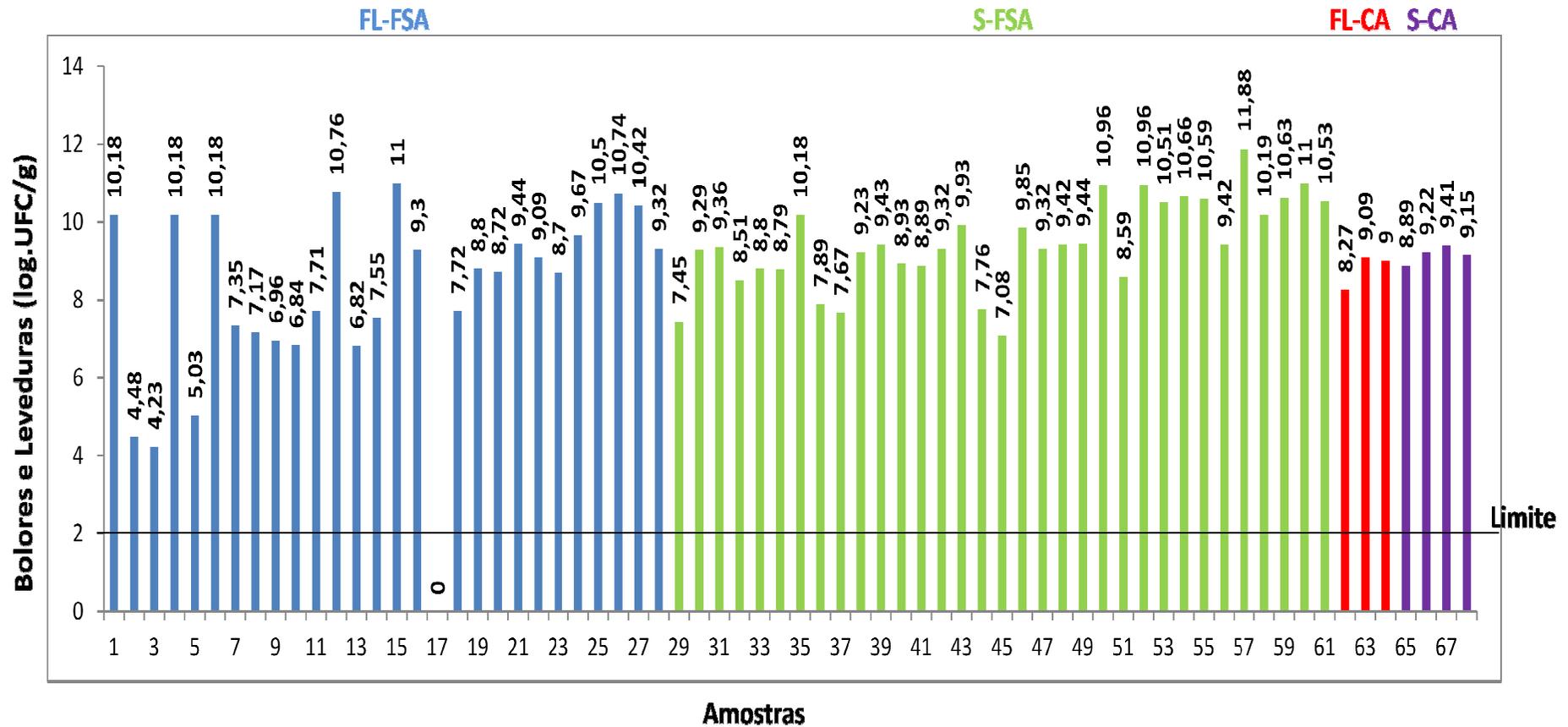


Gráfico 3 – Valores das concentrações de fungos bolores e leveduras obtidas nas amostras de requeijão do Município de Feira de Santana e Cruz das Almas – BA. Fevereiro a junho de 2014.

Log.UFC/g - Logaritmo vezes Unidade Formadora de Colônias por grama.

FL - Feira livre, S – Supermercado, FSA – Feira de Santana, CA – Cruz das Almas, AMT – Amostra.

Os resultados encontrados para a contagem total de microrganismos viáveis, de coliformes totais e de *Escherichia coli* estão representados nos gráficos 4 e 5, com valores em log.UFC/g.

Das 68 amostras analisadas para coliformes totais e *E. coli* nas cidades de Feira de Santana e Cruz das Almas, que estão dentro dos padrões de tolerância foram de 11,76% e 22%, respectivamente.

Mesmo a minoria das amostras estando dentro dos padrões permitido pela legislação, 88,24% apresentaram contaminação elevada para coliformes totais e 78% para *E. coli*, para as cidades estudadas, na qual estão fora dos padrões permitidos pela ANVISA, conforme Resolução RDC nº 12 de 02 de janeiro de 2001, por apresentarem quantidades de coliformes totais, acima de $<1\log.UFC/g$ (Brasil, 2001). De acordo com Salotti et al. (2006) esse grupo de bactérias tem como *habitat* o trato intestinal do homem e outros animais, e quando presente em alimentos é um indicativo de manipulação incorreta e falta da aplicação de procedimentos de boas práticas de fabricação, podendo ser considerado um indicativo de contaminação de origem fecal, evidenciando assim risco à saúde dos consumidores, pois podem estar associadas a microrganismos patogênicos. Além disso, Kousta et al. (2010), afirmam que a presença destes microrganismos em um queijo indica falhas na pasteurização ou contaminação pós-pasteurização, pois esse processo possui o objetivo de eliminar todos os microrganismos indicadores e patógenos.

Para cidade de Cruz das Almas constatou-se a presença de coliformes totais em 100%, com contagem variando de 3,68 log.UFC/g a 6,04 log.UFC/g. A presença de *E. coli* não foi detectada em apenas uma amostra, as demais estão com resultados acima do limite estabelecido na legislação vigente, demonstrando condições higiênico sanitárias insatisfatórias.

Da análise desses resultados, pode-se inferir que a maioria dos requeijões comercializados nestes estabelecimentos não apresentam condições sanitárias para consumo. Outros autores têm relatado a qualidade insatisfatória destes produtos comercializados no país e destacando que não têm sido observadas melhoras neste sentido (Feitosa et al., 2003).

O alto índice de contaminação por microrganismos dos requeijões analisados pode ter ocorrido desde a matéria-prima, quanto pela falta de local adequado para comercialização, pois todos os requeijões encontravam-se expostos sem proteção

adequada ou refrigeração, permitindo uma maior sobrevivência e multiplicação dos microrganismos. A contaminação pelo ar é um grande problema em unidades de produção de alimentos que se preocupam com o controle de qualidade de seus produtos. O ar é um veículo sem flora específica, porém mantém um grande número e variedade de microrganismos em suspensão, não utilizando como substrato, os microrganismos se mantêm nele através das poeiras e das partículas líquidas (Oliveira, Platti e Stadler, 2008).

A finalidade de se avaliar a carga microbiana de microrganismos indicadores dos alimentos é importante porque é através da manutenção da sua padronização que se induz a proteção da saúde do consumidor. Os gastos com consultas e hospitalização, em casos mais graves, seriam diminuídos se, uma vez conhecida a existência e distribuição dos microrganismos investigados, podendo-se colher subsídios para sua minimização ou eliminação nos alimentos sob estudo (Nascimento e Nascimento, 2000).

Os requeijões comercializados nas feiras livres e supermercados das duas cidades apresentam-se em condições higiênicas insatisfatórias, colocando em risco a saúde do consumidor. Recomenda-se a aplicação mais efetiva dos princípios de higiene e sanitização na elaboração dos requeijões, visando oferecer produto com qualidade microbiológica aceitável e aumentar sua vida de prateleira.

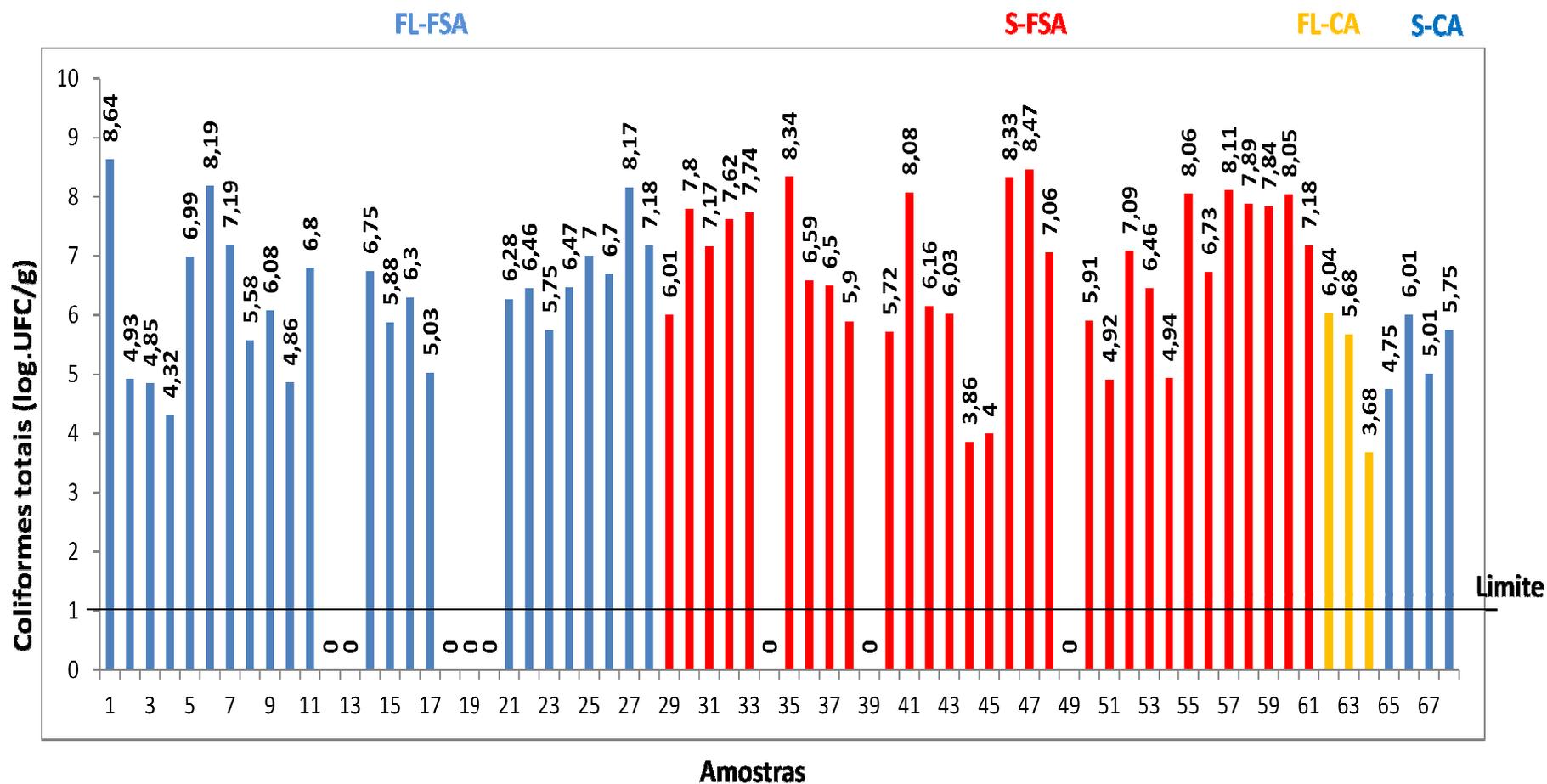


Gráfico 4 – Valores das concentrações de bactérias coliformes totais obtidas nas amostras de requeijão do Município de Feira de Santana e Cruz das Almas – BA. Fevereiro a junho de 2014.

Log.UFC/g - Logaritmo vezes Unidade Formadora de Colônias por grama.

FL - Feira livre, S – Supermercado, FSA – Feira de Santana, CA – Cruz das Almas, AMT – Amostra.

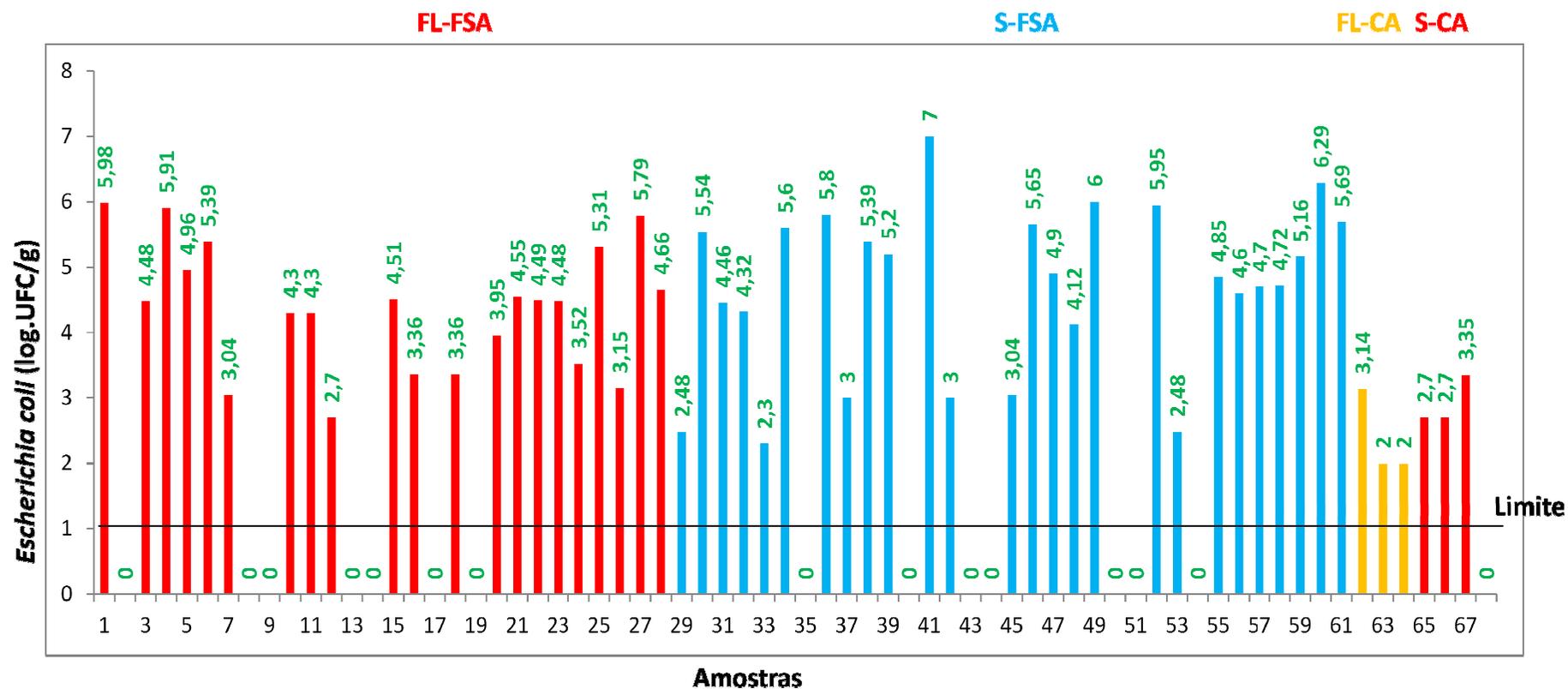


Gráfico 5 – Valores das concentrações de bactérias *Escherichia coli* obtidas nas amostras de requeijão do Município de Feira de Santana e Cruz das Almas – BA. Fevereiro a junho de 2014.

Log.UFC/g - Logarítmo vezes Unidade Formadora de Colônias por grama.

FL - Feira livre, S – Supermercado, FSA – Feira de Santana, CA – Cruz das Almas, AMT – Amostra.

Os resultados da ocorrência de *E. coli* O157 em requeijão encontra-se nas tabelas 5 e 6.

A *E. coli* é uma bactéria patogênica de importância para a saúde pública. Do total das amostras contaminadas com *E. coli* (53), 15 apresentaram positiva para confirmação de *E. coli* O157. É considerado um nível alto encontrado uma vez que todo alimento tem que estar ausente de microrganismos patogênicos.

O requeijão é um alimento rico em nutrientes o que propicia deterioração mais rápida por microrganismos se não estiver armazenado em condição adequada. A higiene é fundamental que deve ir desde a produção da matéria-prima até a produção, armazenamento, transporte e comercialização. Todas essas etapas possuem porta de entrada para contaminação do requeijão.

A presença de *E. coli* em um alimento pode ser avaliada sob dois significados. Inicialmente a *E. coli* por ser uma enterobactéria, indica que este tem contaminação microbiana de origem fecal e portanto está em condições higiênicas insatisfatórias. O outro aspecto a ser considerado é que diversas linhagens de *E. coli* são comprovadamente patogênicas para o homem e animais (Loguercio e Aleixo, 2001).

Conforme demonstrado nas tabelas 5 e 6, verificou-se que, pelo teste Singlepath *E. coli* O157, um teste rápido imunocromático para detecção rápida de *E. coli* O157, quinze amostras (22%) analisadas apresentaram presença característica para *E. coli* O157. O requeijão coletado em ambas cidades tanto nas feiras livres quanto em supermercados apresentaram sete e oito amostras característica para presença de *E. coli* O157 respectivamente. Esses achados são preocupantes pela razão da EHEC ser um importante microrganismo causador de gastroenterites em indivíduos de faixa etária extrema e imunodeprimidos (Franco e Landgraf, 1996). *Escherichia coli* enterohemorrágica (EHEC) é patogênica para os humanos e pertencem ao grupo *E. coli* shigatoxigênica (STEC) (Vicente et al., 2005). Ela é a maior causadora de gastroenterite que pode carrear colite hemorrágica (HC) ou a síndrome urêmica hemolítica (HUS), que é a principal causa de doença renal aguda em crianças. Desde esta identificação como um patógeno em 1982, STEC O157 tem sido considerada causador de sérias doenças, especialmente no Canadá, Japão, Inglaterra e Estados Unidos (Blanco et al., 2003, Bergamini et al., 2007).

Muitas pesquisas se preocupavam apenas com presença de coliformes em queijos, entretanto, desde a ocorrência de surto alimentar causada por *E. coli* enteropatogênica cresceu significativamente a preocupação com a quantidade e qualidade de *E. coli* nestas amostras. Frank e Marth (1978) citaram que *E. coli* enteropatogênica tem habilidade de crescer durante a produção do queijo macio e semi-macio.

O requeijão do norte é um queijo macio, um excelente meio de cultura, pois além do alto índice de umidade é rico em nutrientes o que favorece o crescimento de microrganismos. Assim o requeijão é facilmente contaminado por microrganismos durante todo processo de produção até a comercialização. Uma forma de reduzir a contaminação é submeter esses produtos a refrigeração e fazer uso de embalagens a vácuo, pois assim pode retardar o processo de deterioração do requeijão que tem venda exposta.

Tabela 5. Presença ou ausência de *Escherichia coli* O157, obtidos nas amostras de Requeijão do Município de Cruz da Almas – BA. Fevereiro a junho de 2014.

Amostras	Local	Presença/ Ausência
AMT 62	FL	-
AMT 63	FL	+
AMT 64	FL	+
AMT 65	S	-
AMT 66	S	+
AMT 67	S	-
AMT 68	S	

FL - Feira livre
S – Supermercado

Tabela 6. Presença ou ausência de *Escherichia coli* O157, obtidos nas amostras de Requeijão do Município de Feira de Santana – BA. Fevereiro a junho de 2014.

Amostras	Local	Presença/ Ausência		Amostras	Local	Presença/ Ausência	
AMT 1	FL	-		AMT 29	S	-	
AMT 2	FL			AMT 30	S	-	
AMT 3	FL	+		AMT 31	S	-	
AMT 4	FL	+		AMT 32	S	+	
AMT 5	FL	-		AMT 33	S	+	
AMT 6	FL	-		AMT 34	S	+	
AMT 7	FL	-		AMT 35	S		
AMT 8	FL			AMT 36	S	-	
AMT 9	FL			AMT 37	S	-	
AMT 10	FL	-		AMT 38	S	-	
AMT 11	FL	-		AMT 39	S	-	
AMT 12	FL	+		AMT 40	S		
AMT 13	FL			AMT 41	S	+	
AMT 14	FL			AMT 42	S	-	
AMT 15	FL	+		AMT 43	S		
AMT 16	FL	-		AMT 44	S		
AMT 17	FL			AMT 45	S	+	
AMT 18	FL	-		AMT 46	S	-	
AMT 19	FL			AMT 47	S	-	
AMT 20	FL	-		AMT 48	S	-	
AMT 21	FL	-		AMT 49	S	-	
AMT 22	FL	-		AMT 50	S		
AMT 23	FL	-		AMT 51	S		
AMT 24	FL	-		AMT 52	S	-	
AMT 25	FL	-		AMT 53	S	-	
AMT 26	FL	-		AMT 54	S		
AMT 27	FL	-		AMT 55	S	-	
AMT 28	FL	+		AMT 56	S	-	
-	-			AMT 57	S	-	
-	-			AMT 58	S	-	
-	-			AMT 59	S	+	
-	-			AMT 60	S	+	
-	-			AMT 61	S	-	

FL - Feira livre

S - Supermercado

5. CONCLUSÃO

Os resultados encontrados permitem concluir que as amostras analisadas para todos os microrganismos pesquisados neste trabalho estão em desacordo com a legislação vigente, sendo considerado de má qualidade. Os requeijões analisados estão impróprios para o consumo uma vez que sua contaminação pode causar risco a saúde humana. É mais seguro optar por um produto inspecionado, refrigerado e com embalagens apropriadas, obedecendo à data de fabricação, validade e acondicionamento.

6. AGRADECIMENTOS

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível superior (CAPES),
pela concessão de bolsa de mestrado.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAMS, D.M.; BRAWLEY, T.G. Heat resistant bacterial lipases and ultra-high temperature sterilization of dairy products. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 64, p.1951-1957, 1981.

ALBUQUERQUE, I.P.S.; RODRIGUES, M.A.M. Qualidade microbiológica do queijo tipo mussarela artesanal comercializado em Uberlândia, MG. São Paulo: **Rev. Hig. Alimentar**, v. 22, n. 162, p. 101-105, jun., 2008.

ALMEIDA, P.M.P.; FRANCO, R.M. Avaliação bacteriológica de queijo tipo Minas Frescal com pesquisa de patógenos importantes à Saúde Pública: *Staphylococcus aureus*, *Salmonella* sp e Coliformes Fecais. São Paulo: **Rev. Hig. Alimentar**. v.17, n.111, p. 79-85. ago, 2003.

ALTEKRUSE, S.F.; COHEN, M.L.; SWERDLOW, D.L. Emerging foodborne diseases. **Emerging Infectious Diseases**. v.3, p.285-293, 1997.

AMMON, A. Vigilância das infecções por *E. coli* enterohemorrágica (ECEH) e do síndrome hemolítico-urêmico (SHU) na Europa. **Eurosurv. monthly**, v. 2, n.12, p. 91-96, dec. 1997.

ANDRADE, M.A. Mastite bovina sub-clínica: prevalência, etiologia e testes de sensibilidade a drogas antimicrobianas. **Revista Vet News**, n.49, p.10-16, 2001.

ANDREOLI, S. P.; TRACHTMAN, H.; ACHESON, D. W.; SIEGLER, R. L.; OGRIG, T. G. Hemolytic uremic syndrome: epidemiology, pathophysiology and therapy. **Pediatric Nephrology**, v .17, n. 4, p. 293-298, AOAC, 2002.

ANUALPEC. Anuário da Pecuária Brasileira, **Agra FNP**, 360p, 2009.

APHA. Standard methods for the examination of water and wastewater. 20.ed. Washington: **American Public Health Association**, p.9 (47-66), 1998.

APHA - *American Public Health Association, Standard Methods for the Examination of Dairy Products*, Washington D.C. 14th Ed., 1978.

AQUARONE, E.; BORZANI, W.; SCHMIDELL, W.; LIMA, U.A. *Biotecnologia industrial*, volume 4: biotecnologia na produção de alimentos. Editora Edgard Blücher Ltda, São Paulo, 2001.

ARAÚJO, W.N.; SILVA, M.N.; MARTINEZ, T.C.; SILVEIRA, V.F.; BARROS, S. L.B.; SILVA, A.V.A.F. Isolamento e identificação de coliformes no queijo Minas comercializados na região metropolitana de Salvador/Bahia. **Rev. Bras. Saúde Prod. An.**, v. 2, n. 2, p. 37-42, 2001a.

ARAÚJO, W.N.de; SILVA, M.H.; MARTINEZ, T.C.N.; SILVA, A.V.A.F.; SILVEIRA, V.F.da.; BARROS, S.L.B. Determinação do nível de contaminação por coliformes

totais no queijo Minas comercializado na Região Metropolitana de Salvador – Bahia. *Rev. Bras. Saúde Prod. An.* v. 2, n.1, p. 5-9, 2001b.

ARAÚJO, V.S.de.; SANTOS, E.C.S.; QUEIROZ, M.L.P.; FREITAS, A.C. Análise bacteriológica do queijo Minas Frescal comercializado na cidade do Rio de Janeiro. In: **Congresso Brasileiro de Microbiologia**, 19. Rio de Janeiro, 1997, Anais. Rio de Janeiro: SBM, p. 283, 1997.

ARMSTRONG, G.L.; HOLLINGSWORTH, J. Emerging foodborne pathogens: *Escherichia coli* O157:H7 as a model of entry of a new pathogen into the food supply of the developed world. **Epidemiologic Reviews**, Washington, v.18,n.1, p 29-39, 1996.

BALBANI, A. P. S.; BUTUGAN, O. Contaminação biológica de alimentos. **Pediatria**, v. 23, n. 4, p. 320-328, 2001. Disponível em: <<http://www.pediatrasiapaulo.usp.br/upload/pdf/541.pdf>>. Acessado em: 6 set. 2014.

BARROS, P.C.O.G.; NOGUEIRA, L.C.; RODRIGUEZ, E.M.; CHIAPPINI, C.C. de J. Avaliação da qualidade microbiológica do queijo Minas Frescal comercializado no município do Rio de Janeiro, RJ. São Paulo: **Rev. Hig. Alimentar**, v. 18, n.122, p. 57-61, jul, 2004.

BERGAMINI, A.M.M.; SIMÕES, M.; TRINO, K.; GOMES, T.A.T.; GUTH, B.E.C. Prevalence and characteristics of shiga-producing *Escherichia coli* (STEC) strains in ground beef in São Paulo, Brazil. **Braz. J. Microbiol.** v.38, p.553-556, 2007.

BERTÃO, A.M.S.; SARIDAKIS, H.O. *Escherichia coli* produtora de toxina shiga (STEC): principais fatores de virulência e dados epidemiológicos. **Ciências Biológicas e da Saúde**, v.28, n.2, p.81 - 92, 2007.

BEUTIN, L.; ALEKSIC, S.; ZIMMERMANN, S.; GEIER, K. Virulence factors and phenotypic traits of verotoxigenic strains of *Escherichia coli* isolated from human patients in Germany. **Medical Microbiology and Immunology**, v. 183, p. 13-21, 1994.

BHAGWAT, A. A. Simultaneous detection of *Escherichia coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes* and *Salmonella* strains by real-time PCR. **Food Microbiol.** v.84, p.217- 224, 2003.

BLANCO, M.; BLANCO, J. E.; MORA, A.; REY, J.; ALONSO, J. M.; HERMOSO, M.; HERMOSO, J.; ALONSO, M. P., DAHBI, G.; GONZALEZ, E. A.; BERNÁRDEZ, M. I.; BLANCO, J. Serotypes, virulence genes and intimin types of shiga toxin (verotoxin) – Producing *E. coli* isolates from healthy sheep in Spain. **J Clin Microbiology**. v.41, n.4, p.1351-1356, apr., 2003.

BORGES, G. T.; SANTANA, A. P.; MARTINS, V. A.; OLIVEIRA, Y. S.; SILVA, D. K.; OLIVEIRA, A. S.; MESQUITA, A. J. Contagem padrão de bactérias mesófilas e psicrófilas em leites cru. XXVIII Congresso de Medicina Veterinária. **Anais**. 2001.

BRAMLEY, A.J.; MCKINNON, C.H. The microbiology of raw milk. In: ROBINSON, R.K. Dairy Microbiology: The Microbiology of Milk 2.ed. London/New York: **Elsevier Science Ltda**, 1990. p.163-207.

BRASIL. Ministério da Agricultura. Regulamento de Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem animal- **RIISPOA**. Brasília, 1980.

BRASIL. Leis, Decretos, etc. Resolução RDC 12 de 02 de Janeiro de 2001. Aprova o regulamento técnico sobre padrões microbiológicos para alimentos. **Diário Oficial da União**, Brasília – DF, n.7 – E, seção 1, p. 45-53, 10 de janeiro de 2001b.

BRASIL. Ministério da saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução n.12 de 02 de janeiro de 2001. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**. Brasília, DF, 2001a.

BRASIL. Instrução Normativa n. 62, de 26 de agosto de 2003. Oficializa os métodos analíticos oficiais para análises microbiológicas para controle de produtos de origem animal e água. **Diário Oficial da União, Brasília**, DF, 18 set. 2003. Seção 1, p. 14. Disponível em: < <http://extranet.agricultura.gov.br/sislegisconsulta/consultarLegislacao.do?operacaovisualizar&id=2851> >. Acesso em: 13 mai. 2014.

BYRNES, J.J.; MOAKE, J.L. Thrombotic thrombocytopenic purpura and the haemolytic-uraemic syndrome: evolving concepts of pathogenesis and therapy. **Clinical Haematology**. v.15, n.2, p.413–442, 1986.

CAMPOS, M.R.J.H.; KIPNIS, A.; ANDRÉ, M.C.D.P.B.; VIEIRA, C.A.da. S.; JAYME, L.B., SANTOS, P.P. SERAFINI, A.B. Caracterização fenotípica pelo antibiograma de cepas de *Escherichia coli* isoladas de manipuladores, de leite cru e de queijo “Minas Frescal” em um laticínio de Goiás, Brasil. **Ciênc. Rural**, Santa Maria, v.36, n.4, p. 1221-1227, jul./ago, 2006.

CAVALCANTE, F. R. A. Avaliação do índice de contaminação por coliforme total e fecal, do leite destinado ao consumo humano no município de Sobral-Ceará. XXVIII Congresso de Medicina Veterinária. **Anais**. 2001.

CARDOSO, L.; ARAÚJO, W.M.C. Parâmetros de qualidade em queijos comercializados no Distrito Federal, no período de 1997-2001. São Paulo: **Rev. Hig. Alimentar**. v. 18, n.123, p. 49-53 ago, 2004.

CERQUEIRA, A.M.; GUTH, B.E.; JOAQUIM, R.M. High occurrence of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) in healthy cattle in Rio de Janeiro State, Brazil. **Vet. Microbiol.**, v.70, p.111-121, 1999.

CHEN, L.; DANIEL, R.M.; COOLBEAR, T. Detection and impact of protease and lipase activities in milk and milk powders. **International Dairy Journal**, v.13, p.255-275, 2003.

CHUNG, H.J.; BANG, W.; DRAKE, M.A. Stress response of *Escherichia coli*. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**. v.5, p.52-64, 2006.

COBBOLD, R.; DESMARCHELIER, P. A longitudinal study of shiga-toxigenic *Escherichia coli* (STEC) prevalente in three Australian dairy herds. **Veter. Microbiol.**, v.71, p. 125-137, 2000.

COELHO, K.O. Efeito do nível de células somáticas no leite sobre o rendimento do queijo tipo mussarela. In: Congresso Panamericano de Leite, 9, Porto Alegre. **Anais**. Juiz de Fora, Embrapa Gado de Leite, 1 CD-ROM, 2006.

COIA, J.E. Clinical, microbiological and epidemiological aspects of *Escherichia coli* O157 infection. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, v.20, p. 1-9, 1998.

COUSIN, M.A. Presence and activity of psychrotrophic microorganisms in milk and dairy products: a review. **Journal of Food Protection**, v.45, n.2, p.172-207, fevereiro, 1982.

COUSIN, M. A.; JAY, J. M.; VASAVADA, P. C. Psychrotrophic Microorganisms In: DOWNES, F. P.; ITO, K. Compendium for methods for the Microbiological examination of Foods. 4 ed. American Public Health Association – **APHA**, washington, 676p. Cap. 13, p. 159-166, 2001.

DESMARCHELIER, P.M.; GRAU, F.H. *Escherichia coli*. In: HOCKING, A. D.; ARNOLD, G.; JNSON, I. et al.(Ed.). Foodborne microorganisms of public health significance. Sydney: **Australian Institute of Food Science and Technology Inc.**, Cap. 7, p. 231- 264, 1997.

DOYLE, M.P. *Escherichia coli* O157:H7 and its significance in foods. **International Journal of Food Microbiology**. v.12, n.4, p. 289-302, 1991.

DUARTE, D.A.; SCHUCH, D.M.T.; SANTOS, S.B.; RIBEIRO, A.R.; VASCONCELOS, A.M.M.; SILVA, J.V.D.; MOTA, R.A. Pesquisa de *Listeria monocytogenes* e microrganismos indicadores higiênico-sanitários em queijo de coalho produzido e comercializado no estado de Pernambuco. **Arq. Inst. Biol.**, São Paulo, v. 72, n.3, p. 297-302, jul./set., 2005.

ELDER, R. O.; KEEN, J.E.; SIRAGUSA, G.R.; BARKOCY-GALLACHER, G.A.; KOOHMARAIE, M.; LAEGREID, W. E. Correlation of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157 prevalence in feces, hides, and carcasses of beef cattle during processing. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**, v. 97, p. 2999 - 3003, 2000.

FDA – FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. *Escherichia coli* O157:H7. In: _____. Foodborne Pathogenic Microorganisms and Natural Toxins Handbook. 2009. Disponível em: <<http://www.fda.gov/Food/FoodSafety/Foodbornellness/FoodbornellnessFoodbornePathogensNaturalToxins/BadBugBook/ucm071284.htm>>. Acessado em: 01 jun. 2014.

FEITOSA, T.; BORGES, M. F.; NASSU, R. T.; AZEVEDO, E. H. F.; MUNIZ, C.R. **Pesquisa de *Salmonella sp.*, *Listeria sp.* e microrganismos indicadores higiênico-sanitários em queijos produzidos no Estado do Rio Grande do Norte.** Ciência e Tecnologia de Alimentos, v. 23 (supl.), p.162-165, 2003.

FERNANDES, A.M.; ANDREATTA, E.; OLIVEIRA, C.A.F. **Ocorrência de bactérias patogênicas em queijos no Brasil: questão de Saúde Pública.** Rev. Hig. Alimentar, São Paulo, v.20, n.144, p.4-56, set., 2006.

FRANK, J.F. e MARTH, E.H. **Survey of soft and semisoft cheese for presence of fecal coliforms and serotypes of *Enteropathogenics Escherichia coli*.** J. Food Protect. v.41, n.3, p.198-200, mar.1978.

FRANCO, B.D.G.M.; LANDGRAF, M. **Microbiologia dos alimentos.** São Paulo: Atheneu, 182p, 1996.

FRANCO, B.D.G.M.; LANDGRAF, **Microrganismos patogênicos de importância em alimentos.** In: FRANCO, B.D.G.M.; LANDGRAF, M. Microbiologia de alimentos. São Paulo: Atheneu, 2005.

FRANCO, B.D.G.M.F.; LANDGRAF, M. **Microbiologia dos alimentos. In: Microorganismos indicadores.** Ed. Atheneu, cap.3, p. 27-31, 2008.

FRANCO, B.D.G.de.M.; LANDGRAF, M. **Microbiologia dos alimentos.** São Paulo: Ed. Atheneu, 182p, 1996.

FONSECA, L.F.L.; SANTOS, M.V. **Qualidade do Leite e Controle de Mastite.** São Paulo: Lemos editorial, 2000.

FORSYTHE, S.J. **Microbiologia da segurança alimentar.** Porto alegre: Artmed, 2002.

FRASIER, W.C; WESTHOFF, D.C. **Microbiologia de los Alimentos.** Ed. Acribia, p681, 1993.

GARCIA, P. M. Detecção de *Escherichia coli* O157: H7 em leite por um método convencional e por reação em cadeia da polimerase (PCR). 2006. 68f. **Dissertação** (Mestrado em Tecnologia e Inspeção de Produtos de Origem Animal) Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte. 2006.

GRIFFIN, P.M.; TAUXE, R.V. The epidemiology of infections caused by *Escherichia coli* O157:H7, other enterohemorrhagic *E. coli* and the associated hemolytic uremic syndrome. **Epidemiology Review.** v.13, p.60-98, 1991.

GOMEZ, D.; MILIWEBSKY, E.; PASCUA, F.; BRASCHKIER, C.; MANFREDI, A. E.; ZOTTA, M.; NARIO, F.; PIQUIN, A.; SANZ, M.; ETCHEVERRIA, A.; PADOLA, N.; PARMA, A.; RIVAS, M. Aislamiento de *Escherichia coli* productor de toxina Shiga durante um brote de gastroenteritis en un Jardín Maternal de la ciudad de Mar del Plata. **Revista Argentina de Microbiologia,** v.37, p.176 - 181, 2005.

- GOVARIS, A.; KOIDIS, P.; PAPTAEODOROU, K. Behaviour of *Escherichia coli* O157:H7 in sour milk, cows milk yogurt and ewes' milk yogurt. **Journal of Dairy Research**. v. 69, p.655- 660, 2002.
- GOTTARDI, C. P. T.; MURICY, R. F.; CARDOSO, M. SCHMIDT, V. Qualidade higiênica de leite caprino por contagem de coliformes e estafilococos. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.38, n. 03, p. 743-748, mai-jun, 2008.
- GYLES, C.L. Shiga toxin-producing *Escherichia coli*: Na overview. **Anim. Sci.** 85:E45 -E62, 2007.
- HACKER, J.; BLUM -OEHLER, G.; JANKE, B. et al. Chapter 04: Pathogenicity Islands of Extraintestinal *Escherichia coli*. Pathogenicity Islands and Other Mobile Virulence Elements. **American Society for Microbiology**. Washington D.C.p. 59-76. 1999.
- HANCOCK, D.; BESSER, T.; LEJEUNE, J.; DAVIS, M.; RICE, D. The control of VTEC in the animal reservoir. **International Journal of Food Microbiology**. v.66, n.1-2, p.71-78, 2001.
- HIRSH, D.C.; ZEE, Y.C. **Microbiologia veterinária**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 446p, 2003.
- IRINO, K.; KATO, M.A.M.F.; VAZ, T.M.I.; RAMOS, I.I.; SOUZA, M.A.C.; CRUZ, A.S.; GOMES, T.A.T; VIEIRA, M.A.M.; GUTH, B.E.C. Sorotype and virulence markers of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) isolated from dairy cattle in São Paulo, Brazil. **Vet. Micobiol.**, v. 105, p.29-36, 2005.
- JACKSON, G. J.; LANGFORD, C. F.; ARCHER, L. A. Control of salmonellosis and similar foodborne infections. **Food Control, Amsterdam**, v. 1, n.1, p.26-34, 1991.
- JARDIM, F. B. B.; SILVA, E. N.; OKURA, M. H.; RAMOS, M. A. Influência dos sistemas de pastagem e confinamento na contaminação microbiana de carcaças bovinas. **Ciênc. Tecnologia de Alimentos**, v. 26, n. 2, p. 277- 282, 2006. Disponível em: <www.scielo.br/pdf/cta/v26n2/30173.pdf>. Acesso em: 13 set. 2014.
- JAY, J. M. **Microbiologia de Alimentos**. Porto Alegre: Editora Artmed, 2005.
- KERN, M.E; BLEVINS, K.S. **Micologia Médica**. 2. Ed. São Paulo: Premier, 46 f, 1999.
- KRIEG, N. R.; HOLT, J. G. (Ed.). **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology**. Baltimore: Williams & Wilkins, v. 1, 1984.
- KOUSTA, M.; MATARAGAS, M.; SKANDAMIS, P.; DROSINOS, E. H. Prevalence and sources of cheese contamination with pathogens at farm and processing levels. **Food control**, v. 21, p. 805-815, 2010.
- LACAZ, C.S.; PORTO, E.; HEINS-VACCARI, E.M.; MELO, N.T. **Tratado de micologia médica**. 9 ed. São Paulo: Sarvier, 1104 p., 2002.

LAHTI, E.; EKLUND, M.; RUUTU, P.; SIITONEN, A.; RANTALA, L.; NUORTI, P.; HONKANEN-BUZALSKI. Use of phenotyping and genotyping to verify transmission of *Escherichia coli* O157:H7 from dairy farms. **European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases**. v.21, p.189-195, 2002.

LEITE JÚNIOR, A.F.S., FLORENTINO, E.R., OLIVEIRA, E.B., TORRANO, A.D.M. Qualidade microbiológica do queijo de coalho comercializado à temperatura ambiente ou sob refrigeração, em Campina Grande-PB. **Revista Higiene Alimentar**, v. 14, n. 73, p. 53-59, 2000.

LEITE, M.M.D.; LIMA, M.G.; REIS, R.B. dos. Ocorrência de *Staphylococcus aureus* em queijo Minas tipo Frescal. São Paulo: **Rev. Hig. Alimentar**, v. 19, n.132, p. 89-93, jun. 2005.

LIMA, C. D. L.C. Avaliação microbiológica e química do queijo minas artesanal da Serra do Salitre-MG. 2005.138f. **Tese** (Doutorado em Microbiologia do Instituto de Ciências biológicas) – Universidade Federal de Minas Gerais. 2005.

LOGUERCIO, A.P.; ALEIXO, J.A.G. Microbiologia de queijo tipo Minas Frescal produzido artesanalmente. **Ciênc. Rural**. Santa Maria v. 31, n.6, p. 1063-1067, 2001.

LOURENÇO, L.F.H.; SOUSA, C.L. Análise microbiológica e teste de aceitação de requeijão marajoara elaborado com leite de búfala. **Higiene Alimentar**, v.19, n.132, p.84-88, junho 2005.

LOURENÇO, L.F.H. SOUSA, C.L. Análise microbiológica do requeijão marajoara elaborado no norte do Brasil. **Higiene Alimentar**, v.16, n.96, p.55-59, maio 2002.

MELVILLE, P.A.; RUZ-PERES, M.; YOKOIA, E.; BENITES, N.R. – Ocorrência de fungos em leite cru proveniente de tanques de refrigeração e latões de propriedades leiteiras, bem como de leite comercializado diretamente ao consumidor. **Arq. Inst. Biol.**, São Paulo, v.73, n.3, p.295-301, jul./set., 2006.

MIGUEL, E.M.; TEODORO, V.A.M.; AHASHIRO, E.K.N. Microrganismos psicrotróficos em leite. **Revista do Instituto de laticínios Cândido Tostes**, Juiz de Fora, v.62, n.355, p.38-41, 2007.

MORENO, I.; VIALTA, A.; VALLE, J. L. E. Microrganismos responsáveis pelas principais deteriorações do requeijão e outros queijos fundidos. **Indústria de Laticínios**, São Paulo, n. 41, p.72-75. 2002.

NASCIMENTO, M.da G.F.; NASCIMENTO, E.R. Importância da avaliação microbiológica na qualidade e segurança dos alimentos. Seropédica: **Embrapa Agrobiologia**, dez. 2000. 11p. (Embrapa-CNPAB. Documentos, 120), 2000.

NASSU, R.T.; MACEDO, B.A.; LIMA, M.H.P. Diagnóstico das condições de processamento e caracterização físico-química de queijos regionais e manteiga no Rio Grande do Norte. ISSN 1679-6543. **Embrapa**, Fortaleza, CE, Dez., 2003.

NATARO, J. P.; KAPER, J. B. Diarreagenic *Escherichia coli*. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 11, p. 142-201, 1998.

NÖRNBERG, M. F. B. L.; TONDO, E. C.; BRANDELLI, A. Bactérias psicrotólicas e atividade proteolítica no leite cru refrigerado. **Acta Scientiae Veterinariae**. 37(2): 157-163,2009.

O'BRIEN, A.D.; LAVECK, G.D.; THOMPSON, M.R.; FORMAL, S.B. Producing of *Shigella dysenteriae* type-1 like cytotoxin by *Escherichia coli*. **Journal of Infectious Diseases**. v.146, p.763-769, 1982.

OLIVEIRA, C.A.F.; MORENO, J.F.G.; MESTIERI, L. GERMANO, P. Características físico-químicas e microbiológicas de queijo Minas Frescal e mussarela, produzidos em algumas fábricas de laticínios do Estado de São Paulo. São Paulo: **Rev. Hig. Alimentar**. v. 12, n.55, p.31-35, 1998.

OLIVEIRA, M. J; PALATTI, L. A. P.; STADLER; C. C. S. O uso do ar ambiente no processo de moagem de trigo e o nível de contaminação microbiológica da farinha. 2008. Disponível em: <http://www.pg.cefetpr.br/ppgep/Ebook/ARTIGOS2005/Ebook%202006_artigo%2060.pdf> Acessado em: 02 set. 2014.

OLIVEIRA, C.S.V., Detecção de *Escherichia coli* O157:H7 em leite. **Dissertação de Mestrado em Medicina Veterinária**, Universidade Federal Fluminense, Niterói, Brasil (58p) Março, 2012.

PADHYE, N.V.; M.P. DOYLE. *Escherichia coli* O157:H7: epidemiology, pathogenesis, and methods for detection in food. **Journal of Food Protection**. v.55, n.7, p.555–565, 1992.

PATON, J. C.; PATON, A. W. Pathogenesis and Diagnosis of Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* Infections. **Clinical Microbiology Reviews**, Washington, v. 11, n. 3, p. 450-479, 1998.

PEREIRA, M.L.; GASTELO, M.C.A.; BASTOS, E.M.A.F.; CAIAFFA, W.T.; FALEIRO, E.S.C. Avaliação de ensaios analíticos para detecção de coliformes fecais em queijo Minas. **Arq. Bras. Med. Zootec**. v.51, n.5, Belo Horizonte, p.421-426, out., 1999.

PINTO, P.S.A.; GERMANO, M.I.S.; GERMANO, P.M.L. **Queijo minas: problema emergente da vigilância sanitária**. **Higiene Alimentar**, v.10, n.44, p.22-26, jul./ago. 1996.

QUINTANA, R.C.; CARNEIRO, L.C. Avaliação das condições higiênico-sanitárias do queijo Minas Frescal e mussarela produzidos na cidade de Morrinhos, GO. **Rev. Bras. Saúde. Prod. An.** Local, v.8, n.3, p.205-211, jul./set., 2007.

QUINTANA, R. C.; CARNEIRO, L. C. Avaliação do leite in natura comercializado clandestinamente no município de Morrinhos, GO. **Revista Instituto Adolfo Lutz**, n.65, v. 03, p. 194-198, 2006.

QUINTANILLA, L.B.Z. Anticorpos séricos anti *Escherichia coli* enterohemorrágica (EHEC) em adultos saudáveis da Grande São Paulo. 2005.73 f. **Dissertação** (Mestrado em Análises Clínicas) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo / SP. 2005.

RÊGO, J.C.; STAMFORD, T.L.M; PIRES, E.M.F.; JUNIOR, E.A.S. Proposta de um programa de boas práticas de manipulação e processamento de alimentos para unidades de alimentação e nutrição. **Revista Higiene Alimentar**, vol. 15, nº89, p.22-27, 2001.

RIGOBELLO, E.C. Virulence factors of *Escherichia coli* isolated from diarrheic calves. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, v.58, n.3, p. 305-310, 2006.

RIVAS, M.; MILIWEBSKY, E.; BALBI, L. et al. Intestinal bleeding and occlusion associated with shiga toxin-producing *Escherichia coli* O127: H21. **Medicina**, Buenos Aires, v. 60, p. 249-252, 2000.

RIVERO, M.A.; PADOLA, N.L.; ETCHEVERRÍA, A.I; PARMA, A. *Escherichia coli* enterohemorrágica y Síndrome Urémico Hemolítico en Argentina. **Medicina**, v.64, p.352 - 356, 2004.

ROCHA, J.S.; BURITI, F.C.A.; SAAD, S.M.I. Condições de processamento e comercialização de queijo de Minas Frescal. **Arq. Bras. Méd. Vet. Zootec.** v. 58, n.2. Belo Horizonte, p.236-272, apr. 2006.

ROLDÁN, M.L.; CHINEN, I.; OTERO, J.L.; MILIWEBSKY, E.S.; ALFARO, N.; BURNS, P.; RIVAS, M. Aislamiento, caracterización y subtipificación de cepas de *Escherichia coli* O157:H7 a partir de productos cárnicos y leche. **Revista Argentina de Microbiología**, v.39, p.113 -119, 2007.

ROSA, V.P.da.; PORTO, E.; SPOTO, M.H.F. Avaliação microbiológica e sensorial de queijos Minas frescal embalados sob atmosfera modificada. **Rev. Hig. Alimentar**, v. 19, n.132, p. 58-64, jun. 2005.

SÄDE, E. Leuconostoc spoilage of Refrigerated, packaged foods. Helsinki – Finland, 2011. **Originalmente apresentada para obtenção do grau de mestre** Faculty of Veterinary Medicine, University of Helsinki, 2011.

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**, São Paulo, v.73, n.2, p.171-175, 2006. Disponível em: <http://www.biologico.sp.gov.br/docs/arq/V73_2/salotti.PDF>. Acesso em: 02 set. 2014.

SALYERS, A. A.; WHITT, D. D. Bacterial Pathogenesis: a molecular approach. Washington: **ASM Press**, 448 p, 1994.

SANTOS, M.V.; FONSECA, L.F.L. Importância e efeito de bactérias psicotróficas sobre a qualidade do leite. **Higiene Alimentar**, São Paulo, v.15, n.82, p.13-19, 2001.

SAPATA, F.F.; RUSSO, L.G.; ABREU, T.Q.de.; SILVA, W.A.da.; GONÇALVES, F.B. Ocorrência de *Staphylococcus coagulase* positiva, coliformes totais, coliformes a 45° C e *Escherichia coli*, em queijo Minas Frescal. São Paulo: **Rev. Hig. Alimentar**. v. 22, n. 165, p. 75-81. out, 2008.

SILVA, N.; JUNQUEIRA, V.C.A.; SILVEIRA, N.F.A. **Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos**. São Paulo : Varela, 259p., 1997.

SILVA, N.; JUNQUEIRA, V.C.A.; SILVEIRA, N.F.A.; TANIWAKI, M.H.; SANTOS, R.F.S.; GOMES, R.A.R. **Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos**. São Paulo: Varela, 533p, 2007.

SILVA, M.P.; CAVALLI, D.R.; OLIVEIRA, T.C.R.M. Avaliação do padrão de coliformes a 45° C e comparação da eficiência das técnicas dos tubos múltiplos e Petrifilm EC na detecção de coliformes totais e *Escherichia coli* em alimentos. **Ciênc. Tecnol. Aliment.** v. 26, n.2. Campinas p. 352-359. abr./jun, 2006.

SILVA Jr, E.A. **Manual de Controle Higiênico-Sanitário em Alimentos**. 4. ed. São Paulo: Livraria Varela, 2001.

SPANAMBERG, A.; CAVALLINI, E. M.; SANTURIO, S. J.M.; FERREIRO, L. Mastite micótica em ruminantes causada por leveduras. **Ciência Rural**, v.39, n.1, jan-fev. 2009.

STELLA, A.E.; RIGOBELLO, E.C.; OLIVEIRA, A. C.; MALUTA, R. P.; MARIN, J. M.; ÁVITA, F. A. Ocorrência e sensibilidade microbiana de linhagens de *E. coli* enteropatogênicas isoladas de propriedades leiteiras na região de Ribeirão Preto- SP, Brasil. **Veterinária e Zootecnia**, v.15, n.1, p.66 -74, 2008.

THOMAS, S.B.; THOMAS, B.F. Psychrotrophic bacteria in refrigerated bulk-collected raw milk. Part. 1. **Dairy Industry**., v. 38, p.11-15, 1973.

TRABULSI, L.R. **Microbiologia**. Editora Atheneu, 4 ed, São Paulo, 679p, 2005.

TRABULSI, L.R.; ALTERTHUM, F.; GOMPERTZ, O. F.; CANDEIAS, J.A.N. **Microbiologia**. 3.ed. São Paulo: Atheneu, 718p, 1999.

TRISTÃO, L. C. S.; GONZALEZ, A. G. M.; COUTINHO, C. A. S.; CERQUEIRA, A. M. F.; GOMES, M. J. P.; IRINO, K.; GUTH, B. E. C.; ANDRADE, J. R. C. Virulence markers and genetic relationships of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains from serogroup O111 isolated from cattle. **Vet Microbiol**, v.119, p.358-365, 2007.

UHLICH, G.A.; COOKE, P.H.; SOLOMON, E.B. Analysis of the red-dry-rough phenotype of na *Escherichia coli* O157:H7 strain and its role in biofilm formation and resistance to antibacterial agents. **Applied and Environmental Microbiology** 72, 2564 -2572. 2006.

WEAGANT, S. D.; BRYANT, J. L.; JINNEMN, K. G. An improved rapid technique for isolation of *Escherichia coli* O157:H7 from foods. **Journal of Food Protection**, v.58, n. 1, p. 7-12, 1995.

VICENTE, H.I.G.; AMARAL, L.A.de.; CERQUEIRA, A.de.M.F. Shigatoxigenic *E. coli* serogroups O157, O111 e O113 in feces, water and milk samples from dairy farms. **Braz. J. Microbiol.** v. 36, n.3, São Paulo, p.217-222. jul./set, 2005.

VIDAL, R.; VIDAL, M.; LAGOS, R.; LEVINE, M.; PRADO, V. Multiplex PCR for diagnosis of enteric infections associated with diarrheagenic *Escherichia coli*. **Journal of Clinical Microbiology**. v.42, n.4, p.1787-1789, 2004.

ZHANG, H.; CHEN, F.; WANG, X.; YAO, H. Evaluation of antioxidant activity of parsley (*Petroselinum crispum*) essential oil and identification of its antioxidant constituents. **Food Resear. Internation.**, v.39, p.833-839, 2006.

8. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Houve contaminação por microrganismos mesófilos em todas as amostras de requeijão analisados, porém a presença do mesmo depende das boas práticas aplicadas em todo o processo de produção até a comercialização.

As contaminações por microrganismos psicrotóxicos apresentaram-se baixas, porém em uma quantidade considerável de amostras, sendo que a cidade de Cruz das Almas apresentou apenas uma amostra contaminada.

Nas amostras analisadas provenientes de ambas as cidades para fungos filamentosos (bolors) e leveduras, apresentaram altos níveis de contaminação, são capazes de causar toxinfecções alimentares.

A presença de contaminação de coliformes totais e de *E. coli*, nas amostras foram acima do permitido pela legislação RDC nº 12/2001, mostrando que mesmo a venda não sendo em área aberta (supermercados) não garantiu a qualidade sanitária do produto, indicando a necessidade de uma fiscalização mais rigorosa em relação ao acondicionamento do requeijão durante o período de vendas.

A presença de 22% de *E. coli* O157 característica de *Escherichia coli* enterohemorrágica (EHEC) nos requeijões analisados, mostra que o alimento está inadequado para o consumo humano. Há necessidade de alertar os órgãos competentes pela qualidade e segurança do alimento para consumo humano, já que houve presença de *E. coli* O157 nas duas cidades estudadas.

Não foram constatadas diferenças significativas das contagens dos microrganismos estudados, os quais evidenciaram médias e variações semelhantes.

CAPITULO 1

Ocorrência de coliformes totais e *Escherichia coli* O157 em amostras de requeijões do norte¹

¹Artigo submetido ao comitê editorial do periódico científico Revista Pesquisa Agropecuária Brasileira. Submetido em 03 de dezembro de 2014.

Ocorrência de coliformes e *Escherichia coli* O157 em amostras de requeijões do norte.

Margarete de Jesus Rodrigues⁽¹⁾, Ludmilla Santana Soares e Barros⁽¹⁾, Sílvio Luiz de Oliveira Sógia⁽¹⁾ e Danuza das Virgens Lima⁽¹⁾.

⁽¹⁾Universidade Federal do Recôncavo da Bahia-UFRB. Centro de Ciências Agrárias, Ambientais e Biológicas - CAAB. Rua Rui Barbosa, 710, Centro, Cruz das Almas-Bahia-Brasil, CEP 44380-000. + 55 75 36219751. e-mail: margareterodrigues1@hotmail.com, barros@ufrb.edu.br, ssoglia@ufrb.edu.br, danuza_lima22@hotmail.com.

Resumo - Este trabalho teve como objetivo avaliar a qualidade microbiológica do requeijão típico do nordeste comercializado em feiras livres e supermercados das cidades de Feira de Santana e Cruz das Almas - Bahia, por meio da contagem de coliformes totais, *E. coli* e a ocorrência de *E. coli* O157. Foram coletadas 68 amostras de requeijão, no período de fevereiro a junho de 2014. As análises para cada microrganismo foram baseadas na Instrução Normativa nº 62, de 26 de agosto de 2003 do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, obedecendo às sucessivas diluições tempo e temperatura de cada microrganismo estudado. A contagem das colônias foram expresso em unidades formadora de colônia por mL de amostra. Para presença de *Escherichia coli* O157, foram transferidas para o teste Singlepath *E. coli* O157 colônias proveniente do meio de cultura MEC Broth com Novobiocina. Em relação a presença dos microrganismos estudados, todas apresentaram: 88,24% para coliformes totais, 77,94% para *E. coli* e 22% para o sorotipo *E. coli* O127. Houve presença de coliformes totais, *E. coli* e *E. coli* O157 nas amostras de requeijão

analisados nas quais a maioria dos valores encontrados estavam acima do permitido pela legislação.

Palavras-chave: *Escherichia coli*, Higiene, Bactérias, Contaminação.

Occurrence of coliforms and *Escherichia coli* O157 in northern curd samples

Margarete de Jesus Rodrigues⁽¹⁾, Ludmilla Santana Soares e Barros⁽¹⁾, Sílvio Luiz de Oliveira Sógia⁽¹⁾ e Danuza das Virgens Lima⁽¹⁾.

⁽¹⁾Universidade Federal do Recôncavo da Bahia-UFRB. Centro de Ciências Agrárias, Ambientais e Biológicas - CAAB. Rua Rui Barbosa, 710, Centro, Cruz das Almas-Bahia-Brasil, CEP 44380-000. + 55 75 36219751. e-mail: margareterodrigues1@hotmail.com, barros@ufrb.edu.br, ssoglia@ufrb.edu.br, danuza_lima22@hotmail.com.

Abstract - This work aimed to evaluate the microbiological quality of typical curd Northeast sold in street markets and supermarkets in the cities of Feira de Santana and Cruz das Almas - Bahia by coliforms, *E. coli* and the occurrence of *E. coli* O157. 68 curd samples were collected from February to June 2014. The analysis for each microorganism were based on Normative Instruction No. 62, of August 26, 2003 the Ministry of Agriculture, Livestock and Supply, following the successive dilutions and time temperature of each organism studied. The counting of the colonies were expressed as colony forming units per ml of sample. In *Escherichia coli* O157, were transferred to the test Singlepath *E. coli* O157 colonies from the culture medium MEC Broth with Novobiocin. Regarding the presence of microorganisms

studied , all showed : 88.24 % for total coliforms, 77.94 % for *E. coli* and 22 % for *E. coli* serotype O127. There was presence of fecal coliform , *E. coli* and *E. coli* O157 in the cheese samples analyzed in which the majority of the values found were above those permitted by law .

Keywords: *Escherichia coli* , Hygiene , Bacteria, Contamination.

Introdução

Dentre os produtos derivados de leite, o queijo é considerado um veículo frequente de patógenos de origem alimentar e, em especial, os queijos frescos artesanais, por serem elaborados a partir do leite cru e por não sofrerem processos de maturação. A contaminação microbiológica dos produtos assume destacada relevância tanto para a indústria pelas perdas econômicas, como para a saúde pública, pelo risco de causar doenças transmitidas pelo alimento (FEITOSA et al., 2003).

Os microrganismos indicadores são utilizados para avaliar a qualidade microbiológica dos alimentos e também apontam riscos de contaminações de origem fecal, a provável presença de patógenos ou deterioração potencial do alimento e indicações relevantes sobre as condições higiênico-sanitárias no processamento, na produção e no armazenamento (CARDOSO e ARAÚJO, 2004).

Dentre os possíveis patógenos encontra-se a *E. coli* O157, por ser os bovinos seu principal reservatório. Essa cepa de *E. coli* produtora de shigatoxinas é altamente patogênica e responsável por enfermidades de natureza grave, como a colite hemorrágica, a síndrome hemolítica urêmica e a púrpura trombocitopênica trombótica, que podem ser fatais, principalmente para crianças e idosos (OLIVEIRA, 2012).

Atualmente, o interesse na qualidade dos alimentos aumentou consideravelmente, sobretudo, no que diz respeito aos perigos associados com contaminantes e metabólitos. A qualidade microbiológica do queijo é de primordial importância, por estar relacionado à saúde pública (FERNANDES et al., 2006).

Nesse contexto, avaliar a qualidade microbiológica dos queijos consumidos é importante, uma vez que a ingestão desses alimentos contaminados pode causar diversas Doenças Transmitidas por Alimentos (DTAs) para a população, sendo, portanto, um problema de saúde pública. Desse modo, o objetivo do presente estudo foi avaliar a qualidade microbiológica de requeijão típico do Nordeste comercializado em feiras livres e supermercados das cidades de Feira de Santana e Cruz das Almas - Bahia, através da contagem de coliformes totais, *E. coli* e a ocorrência de *E. coli* O157.

Material e Métodos

Foram coletadas 68 amostras de requeijão, comercializadas em feiras livres e em supermercados nas cidades de Feira de Santana e Cruz das Almas - Bahia, no período de fevereiro a junho de 2014. As amostras foram coletadas em condições assépticas e transportadas em recipiente isotérmico contendo gelo reciclável a mantidas sob refrigeração até o momento das análises realizadas no laboratório de Microbiologia e Parasitologia Animal da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia - UFRB.

As análises microbiológicas foram realizadas de acordo com a recomendação e exigências da RDC nº 12 de 2 janeiro de 2001 (BRASIL, 2001). A metodologia para efetuar as análises microbiológicas foi baseada na Instrução Normativa n. 62, de 26 de agosto de 2003 do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), que oficializa os

métodos analíticos oficiais para análises microbiológicas para controle de produtos de origem animal e água (BRASIL, 2003).

Foram realizadas as seguintes análises microbiológicas: contagem de coliformes totais, *E. coli* e confirmação para presença de *E. coli* O157.

Para a contagem de coliformes totais e *E. coli* foram pesados 25g da amostra e adicionados 225 mL de solução salina peptonada 0,1%, homogeneizados e foram efetuadas as diluições seriadas (10^{-1} a 10^{-6}) empregando-se como solução diluidora 9 mL de salina peptonada a 0,1%, para obter as diluições (10^{-2} , 10^{-4} e 10^{-6}), onde foi transferido 1ml de cada diluição da amostra para uma placa de Petri esterilizada. A contagem foi realizada em meio de cultura Chromocult Coliformes Agar, pela técnica *pour-plate*. As placas foram incubadas em estufa a uma temperatura de 35-37 °C em uma posição invertida durante 24 horas. Posteriormente, foram selecionadas as placas que continham entre 1 a 300 colônias. A detecção simultânea de coliformes totais e *E. coli* foi efetuado usando uma combinação de dois tipos de substratos cromogênicos. O salmão substrato β -D-GAL é clivada pela enzima β -D-galactosidase, característico de outros coliformes, resultando em colônias com coloração salmão para vermelha. O substrato X- β -D-glucuronido é clivada através da enzima β -D-glucuronidase, característico de *E. coli*, resultando em colônias de coloração azul escuro para violeta (ISO 7218:1996 / Emenda 1:2001). A identificação de *E. coli* O157 foi através do Teste rápido imunocromatográfico para detecção *E. coli* O157 (SINGLEPATH *E. COLI* O157 EMB. C/25 TESTES MERCK) (APHA, 1978).

Para propagação e manutenção das colônias de *E. coli*, foi retirado uma colônia e colocada em tubo de ensaios contendo 2ml do meio de cultura Caldo Infusão Cérebro Coração (BHI). Após a inoculação e incubação em estufa a uma temperatura de 35 - 37 °C durante 48 horas foi realizada a estriagem em placas de petri contendo meio de cultura Agar Nutriente para a conservação e manutenção das mesmas. As culturas foram mantidas em

geladeira durante o período de 2 meses, até que toda coleta fosse concluída. Após este período, colônias provenientes do Agar Nutriente, foram inoculadas em caldo de cultura MEC Broth com Novobiocina (MERCK) e incubadas em estufa a uma temperatura de 35 - 37 °C durante 24 horas (APHA, 1978). Após este período foram transferidas para o teste Singlepath *E. coli* O157. É um teste rápido imunocromático para detecção rápida de *E. coli* O157. Este dispositivo de teste tem um ponto de amostragem circular; tem na forma oval, a zona de teste (T) e a zona de controle (C). Ao colocar uma gota da cultura proveniente do MEC Broth com Novobiocina, o ensaio poderá estar funcionando corretamente se uma linha vermelha distinta aparece na zona de controle (C) dentro de 20 minutos. A amostra foi considerada positiva para a confirmação de *E. coli* O157:H7 se antes de 20 minutos as linhas vermelhas aparecerem em ambas zonas, na zona de teste (T) e na zona de controle (C). A amostra foi considerada negativa quando nenhuma linha vermelha apareceu na zona de teste (T) e nem apareceu nitidamente na zona de controle (C) durante 20 minutos após a aplicação da amostra no dispositivo.

Na análise estatística, os dados microbiológicos foram convertidos para logaritmo (log.UFC/g). Foram realizadas através das distribuições absolutas e percentuais para as variáveis nominais e as medidas estatísticas: valor mínimo, valor máximo, média aritmética, variância, coeficiente de variação, utilizou-se a análise de variância, o teste de média (teste de Tukey), tendo como objetivo verificar se houve diferença significativa na detecção dos microrganismos, dos diferentes locais de coletas.

Resultados e Discussão

As avaliações microbiológicas dos requeijões constaram de contagens de microrganismos indicadores de coliformes totais, *E. coli* e patogênicos como a *E. coli* O157,

estão apresentadas nas tabelas de 1 à 7. Das 68 amostras de requeijão analisadas no período de fevereiro à junho de 2014, nas cidades de Feria de Santana e Cruz as Almas, em relação a presença dos microrganismos estudados, todas apresentaram: 88,24% para coliformes totais, 77,94% para *E. coli* e 22% para o sorotipo *E. coli* O157.

A ingestão de requeijão com condições inadequadas para consumo pode levar a graves consequências para a população, sendo portanto, um problema de saúde pública. Segundo a Resolução RDC nº 12, o limite mínimo será o lote aceitável do produto e o limite máximo separa o produto aceitável do inaceitável. Assim valores intermediários entre o limite mínimo e máximo são produtos de qualidade intermediária aceitável, onde a empresa precisa analisar a higiene de processamento dos produtos (BRASIL, 2001).

Os resultados encontrados para a contagem total de microrganismos viáveis, de coliformes totais e de *Escherichia coli* estão apresentados nas tabelas 1, 2, 3 e 4, na forma de log.UFC/g.

Das 68 amostras analisadas para coliformes totais e *E. coli* em Feira de Santana e Cruz das Almas, 11,76% e 22% estão dentro dos padrões de tolerância respectivamente.

Mesmo a minoria das amostras estando dentro dos padrões permitido pela legislação, 88,24% apresentaram contaminação elevada para coliformes totais e 78% para *E. coli* nas duas cidades estudadas na qual estão fora dos padrões permitidos pela ANVISA, por apresentarem quantidades de coliformes totais, acima de $<1\log.UFC/g$ (BRASIL, 2001). De acordo com Salotti et al. (2006) é importante destacar que esse grupo de bactérias tem como *habitat* o trato intestinal do homem e outros animais, e quando presente em alimentos é um indicativo de manipulação incorreta e falta da aplicação de procedimentos de boas práticas de fabricação, podendo ser considerado um indicativo de contaminação de origem fecal, evidenciando assim risco à saúde dos consumidores, pois podem estar associadas a microrganismos patogênicos. Além disso, Kousta et al. (2010) afirmam que a presença destes

microrganismos em um queijo indica falhas na pasteurização ou contaminação pós-pasteurização, pois esse processo possui o objetivo de eliminar todos os microrganismos indicadores e patógenos.

Para cidade de Cruz das Almas constatou-se a presença de coliformes totais em 100%, com contagem variando de 3,68 log.UFC/g a 6,04 log.UFC/g. A presença de *E. coli* não foi detectada em apenas uma amostra, as demais estão com valores acima do limite estabelecido na legislação vigente, demonstrando condições higiênico sanitárias insatisfatórias.

Quando foram comparados o índice de contaminação dos requeijões comercializados verificou-se que, em relação à contagem de coliformes totais e *E. coli*, não houve diferença estatística ($P < 0,01$) entre as duas cidades e nem entre as amostras

A cidade de Faria de Santana apresentou maior média aritmética (5,86 log.UFC/g) na contagem de coliformes totais em feiras livres em relação a média encontrada nas feiras livres da cidade de Cruz das Almas. O alto índice de contaminação por microrganismos dos requeijões analisados pode ter ocorrido desde a matéria-prima, quanto pela falta de local adequado para comercialização, pois todos os requeijões encontravam-se expostos sem proteção adequada ou refrigeração, permitindo uma maior sobrevivência e multiplicação dos microrganismos. A contaminação pelo ar é um grande problema em unidades de produção de alimentos que se preocupam com o controle de qualidade de seus produtos. O ar é um veículo sem flora específica, porém mantém um grande número e variedade de microrganismos em suspensão, não utilizando como substrato, os microrganismos se mantêm nele através das poeiras e das partículas líquidas (OLIVEIRA et al., 2008).

Nos valores observados na tabela 5, houve diferença no valor de CV entre as cidades analisadas para coliformes totais. A cidade de Faria de Santana (FSA – FL) apresentou CV de 35,32%, seguido pelo valor de 16,89% para (FSA-S), em Cruz das Almas (CA-FL) o CV foi 25,34% e 11,15% e para (CA-S). Assim, os requeijões coletados nos supermercados de Cruz

das Almas (CA-S) apresentaram valores mais homogêneos em relação as amostras adquiridas nos outros locais de coletas analisadas. Porém, analisando pelo desvio padrão, as amostras coletadas em supermercados da cidade de Cruz das Almas (CA-S) apresentou o menor valor de 0,60 demonstrando que as amostras não apresentaram valores muito diferentes entre si.

Embora para *E. coli*, os valores encontrados para feiras livres da cidade de Feira de Santana (FSA-FL) tenha apresentado o menor valor do CV de 21,90%, as amostras das feiras livres de cidade da cidade de Cruz das Almas (CA-FL) apresentou o menor valor de desvio padrão 0,66 sendo suas amostras mais homogêneas em relação aos outros locais de coleta analisados.

Os requeijões comercializados nas feiras livres e supermercados das duas cidades apresentam-se em condições higiênicas insatisfatórias, colocando em risco a saúde do consumidor. Recomenda-se a aplicação mais efetiva dos princípios de higiene e sanitização na elaboração dos requeijões, visando oferecer produto com qualidade microbiológica aceitável e aumentar sua vida de prateleira.

Os resultados da ocorrência de *E. coli* O157 em requeijão encontra-se nas tabelas 6 e 7. A *E. coli* é uma bactéria patogênica de importância para a saúde pública, do total das amostras contaminadas com *E. coli* (53), 15 apresentaram positiva para confirmação de *E. coli* O157. É considerado um nível alto encontrado uma vez que todo alimento tem que estar ausente de microrganismos patogênicos.

O requeijão é um alimento rico em nutrientes o que propicia deterioração mais rápida por microrganismos se não estiver armazenado em condição adequada. A higiene é fundamental que deve ir desde a produção da matéria-prima até a produção, armazenamento, transporte e comercialização do requeijão. Todas essas etapas possuem porta para contaminação do requeijão.

Através do teste Singlepath *E. coli* O157, um teste imunocromático para detecção rápida de *E. coli* O157, quinze amostras (22%) analisadas apresentaram presença característica para *E. coli* O157. O requeijão coletado em ambas cidades tanto nas feiras livres quanto em supermercados apresentaram sete e oito amostras característica para presença de *E. coli* O157 respectivamente. Esses achados são preocupantes pela razão da EHEC ser um importante microrganismo causador de gastroenterites em indivíduos de faixa etária extrema e imunodeprimidos. A *E. coli* enterohemorrágica (EHEC) é patogênica para os humanos e pertencem ao grupo *E. coli* shigatoxigênica (STEC) (VICENTE et al., 2005). Ela é a maior causadora de gastroenterite que pode carrear colite hemorrágica (HC) ou a síndrome hemolítica urêmica (HUS), que é a principal causa de doença renal aguda em crianças. Desde esta identificação como um patógeno em 1982, STEC O157 tem sido considerada causador de sérias doenças, especialmente no Canadá, Japão, Inglaterra e Estados Unidos (BLANCO et al., 2003, BERGAMINI et al., 2007).

Conclusões

Os resultados obtidos na avaliação microbiológica do requeijão revelaram a ocorrência de coliformes totais, *E. coli* e *E. coli* O157 com valores acima do permitido pela legislação vigente.

Agradecimentos

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível superior (CAPES), pela concessão de bolsa de mestrado.

Referências

APHA - American **Public Health Association**, **Standard Methods for the Examination of Dairy Products**, Washington D.C. 14th Ed., 1978.

BERGAMINI, A.M.M.; SIMÕES, M.; TRINO, K.; GOMES, T.A.T.; GUTH, B.E.C. Prevalence and characteristics of shiga-producing *Escherichia coli* (STEC) strains in ground beef in São Paulo, Brazil. **Braz. J. Microbiol.** v.38, p.553-556, 2007.

BLANCO, M.; BLANCO, J. E.; MORA, A.; REY, J.; ALONSO, J. M.; HERMOSO, M.; HERMOSO, J.; ALONSO, M. P., DAHBI, G.; GONZALEZ, E. A.; BERNÁRDEZ, M. I.; BLANCO, J. Serotypes, virulence genes and intimin types of shiga toxin (verotoxin) Producing *E. coli* isolates from healthy sheep in Spain. **J Clin Microbiology**. v.41, p.1351-1356, apr., 2003. 101

BRASIL. Leis, Decretos, etc. Resolução RDC 12 de 02 de Janeiro de 2001. **Aprova o regulamento técnico sobre padrões microbiológicos para alimentos**. Diário Oficial da União, Brasília – DF, n.7 – E, seção 1, p. 45-53, 10 de janeiro de 2001

BRASIL. Instrução Normativa n. 62, de 26 de agosto de 2003. **Oficializa os métodos analíticos oficiais para análises microbiológicas para controle de produtos de origem animal e água**. Diário Oficial da União, Brasília, DF, 18 set. 2003. Seção 1, p. 14. Disponível em: <http://extranet.agricultura.gov.br/sislegisconsulta/consultarLegislacao.do?operacaovisualizar&id=2851> >. Acesso em: 13 mai. 2014.

CARDOSO, L.; ARAÚJO, W.M.C. Parâmetros de qualidade em queijos comercializados no Distrito Federal, no período de 1997-2001. São Paulo: **Rev. Hig. Alimentar**. v. 18, n.123, p. 49-53 ago, 2004.

FEITOSA, T.; BORGES, M. F.; NASSU, R. T.; AZEVEDO, E. H. F.; MUNIZ, C.R. Pesquisa de *Salmonella sp.*, *Listeria sp.* e microrganismos indicadores higiênico-sanitários em queijos produzidos no Estado do Rio Grande do Norte. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 23 (supl.), p.162-165, 2003.

FERNANDES, A.M.; ANDREATTA, E.; OLIVEIRA, C.A.F. Ocorrência de bactérias patogênicas em queijos no Brasil: questão de Saúde Pública. **Rev. Hig. Alimentar**, São Paulo, v.20, n.144, p.4-56, set., 2006.

KOUSTA, M.; MATARAGAS, M.; SKANDAMIS, P.; DROSINOS, E. H. Prevalence and sources of cheese contamination with pathogens at farm and processing levels. **Food control**, v. 21, p. 805-815, 2010.

OLIVEIRA, M. J; PALATTI, L. A. P.; STADLER; C. C. S. **O uso do ar ambiente no processo de moagem de trigo e o nível de contaminação microbiológica da farinha**.2008. Disponível em: http://www.pg.cefetpr.br/ppgep/Ebook/ARTIGOS2005/Ebook%202006_artigo%2060.pdf.> Acessado em: 02 set. 2014.

OLIVEIRA, C.S.V., **Detecção de *Escherichia coli* O157:H7 em leite**. Dissertação de Mestrado em Medicina Veterinária, Universidade Federal Fluminense, Niterói, Brasil (58p) Março, 2012.

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, São Paulo, v.73, n.2, p.171-175, 2006. Disponível em: <http://www.biologico.sp.gov.br/docs/arq/V73_2/salotti.PDF>. Acesso em: 02 set. 2014.

VICENTE, H.I.G.; AMARAL, L.A.de.; CERQUEIRA, A.de.M.F. Shigatoxigenic *E. coli* serogroups O157, O111 e O113 in feces, water and milk samples from dairy farms. Braz. **J. Microbiol.** v. 36, n.3, São Paulo, p.217-222. jul./set, 2005.

Tabela 1. Valores absolutos e média aritmética das concentrações de Coliformes totais (CT), obtidas nas amostras de Requeijão do Município de Feira de Santana – BA. Fevereiro a junho de 2014.

Amostras	Local	CT (log.UFC/g)*	Amostras	Local	CT (log.UFC/g)*
AMT 1	FL	8,64	AMT 29	S	6,01
AMT 2	FL	4,93	AMT 30	S	7,80
AMT 3	FL	4,85	AMT 31	S	7,17
AMT 4	FL	4,32	AMT 32	S	7,62
AMT 5	FL	6,99	AMT 33	S	7,74
AMT 6	FL	8,19	AMT 34	S	0,00
AMT 7	FL	7,19	AMT 35	S	8,34
AMT 8	FL	5,58	AMT 36	S	6,59
AMT 9	FL	6,08	AMT 37	S	6,50
AMT 10	FL	4,86	AMT 38	S	5,90
AMT 11	FL	6,80	AMT 39	S	0,00
AMT 12	FL	0,00	AMT 40	S	5,72
AMT 13	FL	0,00	AMT 41	S	8,08
AMT 14	FL	6,75	AMT 42	S	6,16
AMT 15	FL	5,88	AMT 43	S	6,03
AMT 16	FL	6,30	AMT 44	S	3,86
AMT 17	FL	5,03	AMT 45	S	4,00
AMT 18	FL	0,00	AMT 46	S	8,33
AMT 19	FL	0,00	AMT 47	S	8,47
AMT 20	FL	0,00	AMT 48	S	7,06
AMT 21	FL	6,28	AMT 49	S	0,00
AMT 22	FL	6,46	AMT 50	S	5,91
AMT 23	FL	5,75	AMT 51	S	4,92
AMT 24	FL	6,47	AMT 52	S	7,09
AMT 25	FL	7,00	AMT 53	S	6,46
AMT 26	FL	6,70	AMT 54	S	4,94
AMT 27	FL	8,17	AMT 55	S	8,06
AMT 28	FL	7,18	AMT 56	S	6,73
-	-	-	AMT 57	S	8,11
-	-	-	AMT 58	S	7,89
-	-	-	AMT 59	S	7,84
-	-	-	AMT 60	S	8,05
-	-	-	AMT 61	S	7,18
Média			Média		
Aritmética		5,86	Aritmética		7,58

* Logarítmo vezes Unidade Formadora de Colônias por grama

FL - Feira livre

S - Supermercado

AMT - Amostra

Tabela 2. Valores absolutos e média aritmética das concentrações de Coliformes totais (CT), obtidas nas amostras de Requeijão do Município de Cruz das Almas – BA. Fevereiro a junho de 2014.

Amostras	Local	CT (log.UFC/g)*	Amostras	Local	CT (log.UFC/g)*
AMT 62	FL	6,04	AMT 65	S	4,75
AMT 63	FL	5,68	AMT 66	S	6,01
AMT 64	FL	3,68	AMT 67	S	5,01
-	-	-	AMT 68	S	5,75
Média			Média		
Aritmética		5,13	Aritmética		5,38

* Logarítmo vezes Unidade Formadora de Colônias por grama

FL - Feira livre

S - Supermercado

AMT - Amostra

Tabela 3. Valores absolutos e média geométrica das concentrações de *E. coli*, obtidas nas amostras de Requeijão do Município de Cruz das Almas – BA. Fevereiro a junho de 2014.

Amostras	Local	<i>E. coli</i> (log.UFC/g)*	Amostras	Local	<i>E. coli</i> (log.UFC/g)*
AMT 62	FL	3,14	AMT 65	S	2,70
AMT 63	FL	2,00	AMT 66	S	2,70
AMT 64	FL	2,00	AMT 67	S	3,35
-	-	-	AMT 68	S	0,00
Média			Média		
Aritmética		2,38	Aritmética		2,92

*Logarítmo vezes Unidade Formadora de Colônias por grama

FL - Feira livre

S - Supermercado

AMT - Amostra

Tabela 4. Valores absolutos e média aritmética das concentrações de *E. coli*, obtidas nas amostras de Requeijão do Município de Feira de Santana – BA. Fevereiro a junho de 2014.

Amostras	Local	<i>E. coli</i> (log.UFC/g)*	Amostras	Local	<i>E. coli</i> (log.UFC/g)*
AMT 1	FL	5,98	AMT 29	S	2,48
AMT 2	FL	0,00	AMT 30	S	5,54
AMT 3	FL	4,48	AMT 31	S	4,46
AMT 4	FL	5,91	AMT 32	S	4,32
AMT 5	FL	4,96	AMT 33	S	2,30
AMT 6	FL	5,39	AMT 34	S	5,60
AMT 7	FL	3,04	AMT 35	S	0,00
AMT 8	FL	0,00	AMT 36	S	5,80
AMT 9	FL	0,00	AMT 37	S	3,00
AMT 10	FL	4,30	AMT 38	S	5,39
AMT 11	FL	4,30	AMT 39	S	5,20
AMT 12	FL	2,70	AMT 40	S	0,00
AMT 13	FL	0,00	AMT 41	S	7,00
AMT 14	FL	0,00	AMT 42	S	3,00
AMT 15	FL	4,51	AMT 43	S	0,00
AMT 16	FL	3,36	AMT 44	S	0,00
AMT 17	FL	0,00	AMT 45	S	3,04
AMT 18	FL	3,36	AMT 46	S	5,65
AMT 19	FL	0,00	AMT 47	S	4,90
AMT 20	FL	3,95	AMT 48	S	4,12
AMT 21	FL	4,55	AMT 49	S	6,00
AMT 22	FL	4,49	AMT 50	S	0,00
AMT 23	FL	4,48	AMT 51	S	0,00
AMT 24	FL	3,52	AMT 52	S	5,95
AMT 25	FL	5,31	AMT 53	S	2,48
AMT 26	FL	3,15	AMT 54	S	0,00
AMT 27	FL	5,79	AMT 55	S	4,85
AMT 28	FL	4,66	AMT 56	S	4,60
-	-	-	AMT 57	S	4,70
-	-	-	AMT 58	S	4,72
-	-	-	AMT 59	S	5,16
-	-	-	AMT 60	S	6,29
-	-	-	AMT 61	S	5,69
Média			Média		
Aritmética		4,39	Aritmética		2,53

* Logarítmo vezes Unidade Formadora de Colônias por grama

FL - Feira livre

S - Supermercado

AMT - Amostra

Tabela 5 – Resultados do desvio padrão e coeficiente de variação dos Coliformes totais e *E. coli* analisadas nas cidades de Fera de Santana (FSA) e Cruz das Almas (CA).

Microrganismos log.UFC/g	Desvio Padrão (S)	Coeficiente de Variação (CV)
Coliformes totais (FSA – FL)	2,07	35,32 %
Coliformes totais (FSA – S)	1,28	16,89 %
Coliformes totais (CA – FL)	1,30	25,34 %
Coliformes totais (CA – S)	0,60	11,15 %
<i>E. coli</i> (FSA – FL)	0,96	21,90 %
<i>E.coli</i> (FSA – S)	1,18	46,64 %
<i>E.coli</i> (CA – FL)	0,66	27,73 %
<i>E. coli</i> (CA – S)	1,50	51,37 %

FSA – FL – Feira de Santana – Feira livre

FSA – S – Feira de Santana – Supermercado

CA – FL – Cruz das Almas – Feira livre

CA – S – Cruz das Almas – Supermercado.

Tabela 6. Presença ou ausência de *Escherichia coli* O157, obtidos nas amostras de Requeijão do Município de Feira de Santana – BA. Fevereiro a junho de 2014.

Amostras	Local	Presença/ Ausência	Amostras	Local	Presença/ Ausência
AMT 1	FL	-	AMT 29	S	-
AMT 2	FL		AMT 30	S	-
AMT 3	FL	+	AMT 31	S	-
AMT 4	FL	+	AMT 32	S	+
AMT 5	FL	-	AMT 33	S	+
AMT 6	FL	-	AMT 34	S	+
AMT 7	FL	-	AMT 35	S	
AMT 8	FL		AMT 36	S	-
AMT 9	FL		AMT 37	S	-
AMT 10	FL	-	AMT 38	S	-
AMT 11	FL	-	AMT 39	S	-
AMT 12	FL	+	AMT 40	S	
AMT 13	FL		AMT 41	S	+
AMT 14	FL		AMT 42	S	-
AMT 15	FL	+	AMT 43	S	
AMT 16	FL	-	AMT 44	S	
AMT 17	FL		AMT 45	S	+
AMT 18	FL	-	AMT 46	S	-
AMT 19	FL		AMT 47	S	-
AMT 20	FL	-	AMT 48	S	-
AMT 21	FL	-	AMT 49	S	-
AMT 22	FL	-	AMT 50	S	
AMT 23	FL	-	AMT 51	S	
AMT 24	FL	-	AMT 52	S	-
AMT 25	FL	-	AMT 53	S	-
AMT 26	FL	-	AMT 54	S	
AMT 27	FL	-	AMT 55	S	-
AMT 28	FL	+	AMT 56	S	-
-	-		AMT 57	S	-
-	-		AMT 58	S	-
-	-		AMT 59	S	+
-	-		AMT 60	S	+
-	-		AMT 61	S	-

FL - Feira livre

S - Supermercado

AMT - Amostra

Tabela 7. Presença ou ausência de *Escherichia coli* O157, obtidos nas amostras de Requeijão do Município de Cruz da Almas – BA. Fevereiro a junho de 2014.

Amostras	Local	Presença/ Ausência
AMT 62	FL	-
AMT 63	FL	+
AMT 64	FL	+
AMT 65	S	-
AMT 66	S	+
AMT 67	S	-
AMT 68	S	-

FL - Feira livre

S – Supermercado

AMT - Amostra

ANEXO I

Diretrizes para Autores

Escopo e política editorial

A revista Pesquisa Agropecuária Brasileira (PAB) é uma publicação mensal da Embrapa, que edita e publica trabalhos técnico-científicos originais, em português, espanhol ou inglês, resultantes de pesquisas de interesse agropecuário. A principal forma de contribuição é o Artigo, mas a PAB também publica Notas Científicas e Revisões a convite do Editor.

Análise dos artigos

A Comissão Editorial faz a análise dos trabalhos antes de submetê-los à assessoria científica. Nessa análise, consideram-se aspectos como escopo, apresentação do artigo segundo as normas da revista, formulação do objetivo de forma clara, clareza da redação, fundamentação teórica, atualização da revisão da literatura, coerência e precisão da metodologia, resultados com contribuição significativa, discussão dos fatos observados em relação aos descritos na literatura, qualidade das tabelas e figuras, originalidade e consistência das conclusões. Após a aplicação desses critérios, se o número de trabalhos aprovados ultrapassa a capacidade mensal de publicação, é aplicado o critério da relevância relativa, pelo qual são aprovados os trabalhos cuja contribuição para o avanço do conhecimento científico é considerada mais significativa. Esse critério é aplicado somente aos trabalhos que atendem aos requisitos de qualidade para publicação na revista, mas que, em razão do elevado número, não podem ser todos aprovados para publicação. Os trabalhos rejeitados são devolvidos aos autores e os demais são submetidos à análise de assessores científicos, especialistas da área técnica do artigo.

Forma e preparação de manuscritos

Os trabalhos enviados à PAB devem ser inéditos (não terem dados – tabelas e figuras – publicadas parcial ou integralmente em nenhum outro veículo de divulgação técnico-científica, como boletins institucionais, anais de eventos, comunicados técnicos, notas científicas etc.) e não podem ter sido encaminhados simultaneamente a outro periódico científico ou técnico. Dados publicados na forma de resumos, com mais de 250 palavras, não devem ser incluídos no trabalho.

- São considerados, para publicação, os seguintes tipos de trabalho: Artigos Científicos, Notas Científicas e Artigos de Revisão, este último a convite do Editor.
- Os trabalhos publicados na PAB são agrupados em áreas técnicas, cujas principais são: Entomologia, Fisiologia Vegetal, Fitopatologia, Fitotecnia, Fruticultura, Genética, Microbiologia, Nutrição Mineral, Solos e Zootecnia.
- O texto deve ser digitado no editor de texto Microsoft Word, em espaço duplo, fonte Times New Roman, corpo 12, folha formato A4, com margens de 2,5 cm e com páginas e linhas numeradas.

Informações necessárias na submissão on-line de trabalhos

No passo 1 da submissão (Início), em “comentários ao editor”, informar a relevância e o aspecto inédito do trabalho.

No passo 2 da submissão (Transferência do manuscrito), carregar o trabalho completo em arquivo Microsoft Word.

No passo 3 da submissão (Inclusão de metadados), em “resumo da biografia” de cada autor, informar o link do sistema de currículos lattes (ex.: <http://lattes.cnpq.br/0577680271652459>). Clicar em “incluir autor” para inserir todos os coautores do trabalho, na ordem de autoria.

Ainda no passo 3, copiar e colar o título, resumo e termos para indexação (key words) do trabalho nos respectivos campos do sistema.

No passo 4 da submissão (Transferência de documentos suplementares), carregar, no sistema on-line da revista PAB, um arquivo Word com todas as cartas (mensagens) de concordância dos coautores coladas conforme as explicações abaixo:

- Colar um e-mail no arquivo word de cada coautor de concordância com o seguinte conteúdo:

“Eu, ..., concordo com o conteúdo do trabalho intitulado “.....” e com a submissão para a publicação na revista PAB.

Como fazer:

Peça ao coautor que lhe envie um e-mail de concordância, encaminhe-o para o seu próprio e-mail (assim gerará os dados da mensagem original: assunto, data, de e para), marque todo o email e copie e depois cole no arquivo word. Assim, teremos todas as cartas de concordâncias dos co-autores num mesmo arquivo.

Organização do Artigo Científico

A ordenação do artigo deve ser feita da seguinte forma:

- Artigos em português - Título, autoria, endereços institucionais e eletrônicos, Resumo, Termos para indexação, título em inglês, Abstract, Index terms, Introdução, Material e Métodos, Resultados e Discussão, Conclusões, Agradecimentos, Referências, tabelas e figuras.

- Artigos em inglês - Título, autoria, endereços institucionais e eletrônicos, Abstract, Index terms, título em português, Resumo, Termos para indexação, Introduction, Materials and Methods, Results and Discussion, Conclusions, Acknowledgements, References, tables, figures.

- Artigos em espanhol - Título, autoria, endereços institucionais e eletrônicos, Resumen, Términos para indexación; título em inglês, Abstract, Index terms, Introducción, Materiales y Métodos, Resultados y Discusión, Conclusiones, Agradecimientos, Referencias, cuadros e figuras.

- O título, o resumo e os termos para indexação devem ser vertidos fielmente para o inglês, no caso de artigos redigidos em português e espanhol, e para o português, no caso de artigos redigidos em inglês.
- O artigo científico deve ter, no máximo, 20 páginas, incluindo-se as ilustrações (tabelas e figuras), que devem ser limitadas a seis, sempre que possível.

Título

- Deve representar o conteúdo e o objetivo do trabalho e ter no máximo 15 palavras, incluindo-se os artigos, as preposições e as conjunções.
- Deve ser grafado em letras minúsculas, exceto a letra inicial, e em negrito.
- Deve ser iniciado com palavras chaves e não com palavras como “efeito” ou “influência”.
- Não deve conter nome científico, exceto de espécies pouco conhecidas; neste caso, apresentar somente o nome binário.
- Não deve conter subtítulo, abreviações, fórmulas e símbolos.
- As palavras do título devem facilitar a recuperação do artigo por índices desenvolvidos por bases de dados que catalogam a literatura.

Nomes dos autores

- Grafar os nomes dos autores com letra inicial maiúscula, por extenso, separados por vírgula; os dois últimos são separados pela conjunção “e”, “y” ou “and”, no caso de artigo em português, espanhol ou em inglês, respectivamente.
- O último sobrenome de cada autor deve ser seguido de um número em algarismo arábico, em forma de expoente, entre parênteses, correspondente à chamada de endereço do autor.

Endereço dos autores

- São apresentados abaixo dos nomes dos autores, o nome e o endereço postal completos da instituição e o endereço eletrônico dos autores, indicados pelo número em algarismo arábico, entre parênteses, em forma de expoente.
- Devem ser agrupados pelo endereço da instituição.
- Os endereços eletrônicos de autores da mesma instituição devem ser separados por vírgula.

Resumo

- O termo Resumo deve ser grafado em letras minúsculas, exceto a letra inicial, na margem esquerda, e separado do texto por travessão.

- Deve conter, no máximo, 200 palavras, incluindo números, preposições, conjunções e artigos.
- Deve ser elaborado em frases curtas e conter o objetivo, o material e os métodos, os resultados e a conclusão.
- Não deve conter citações bibliográficas nem abreviaturas.
- O final do texto deve conter a principal conclusão, com o verbo no presente do indicativo.

Termos para indexação

- A expressão Termos para indexação, seguida de dois-pontos, deve ser grafada em letras minúsculas, exceto a letra inicial.
- Os termos devem ser separados por vírgula e iniciados com letra minúscula.
- Devem ser no mínimo três e no máximo seis, considerando-se que um termo pode possuir duas ou mais palavras.
- Não devem conter palavras que componham o título.
- Devem conter o nome científico (só o nome binário) da espécie estudada.
- Devem, preferencialmente, ser termos contidos no AGROVOC: Multilingual Agricultural Thesaurus ou no Índice de Assuntos da base SciELO.

Introdução

- A palavra Introdução deve ser centralizada e grafada com letras minúsculas, exceto a letra inicial, e em negrito.
- Deve apresentar a justificativa para a realização do trabalho, situar a importância do problema científico a ser solucionado e estabelecer sua relação com outros trabalhos publicados sobre o assunto.
- O último parágrafo deve expressar o objetivo de forma coerente com o descrito no início do Resumo.

Material e Métodos

- A expressão Material e Métodos deve ser centralizada e grafada em negrito; os termos Material e Métodos devem ser grafados com letras minúsculas, exceto as letras iniciais.
- Deve ser organizado, de preferência, em ordem cronológica.
- Deve apresentar a descrição do local, a data e o delineamento do experimento, e indicar os tratamentos, o número de repetições e o tamanho da unidade experimental.

- Deve conter a descrição detalhada dos tratamentos e variáveis.
- Deve-se evitar o uso de abreviações ou as siglas.
- Os materiais e os métodos devem ser descritos de modo que outro pesquisador possa repetir o experimento.
- Devem ser evitados detalhes supérfluos e extensas descrições de técnicas de uso corrente.
- Deve conter informação sobre os métodos estatísticos e as transformações de dados.
- Deve-se evitar o uso de subtítulos; quando indispensáveis, grafá-los em negrito, com letras minúsculas, exceto a letra inicial, na margem esquerda da página.

Resultados e Discussão

- A expressão Resultados e Discussão deve ser centralizada e grafada em negrito, com letras minúsculas, exceto a letra inicial.
- Todos os dados apresentados em tabelas ou figuras devem ser discutidos.
- As tabelas e figuras são citadas seqüencialmente.
- Os dados das tabelas e figuras não devem ser repetidos no texto, mas discutidos em relação aos apresentados por outros autores.
- Evitar o uso de nomes de variáveis e tratamentos abreviados.
- Dados não apresentados não podem ser discutidos.
- Não deve conter afirmações que não possam ser sustentadas pelos dados obtidos no próprio trabalho ou por outros trabalhos citados.
- As chamadas às tabelas ou às figuras devem ser feitas no final da primeira oração do texto em questão; se as demais sentenças do parágrafo referirem-se à mesma tabela ou figura, não é necessária nova chamada.
- Não apresentar os mesmos dados em tabelas e em figuras.
- As novas descobertas devem ser confrontadas com o conhecimento anteriormente obtido.

Conclusões

- O termo Conclusões deve ser centralizado e grafado em negrito, com letras minúsculas, exceto a letra inicial.
- Devem ser apresentadas em frases curtas, sem comentários adicionais, com o verbo no presente do indicativo.

- Devem ser elaboradas com base no objetivo do trabalho.
- Não podem consistir no resumo dos resultados.
- Devem apresentar as novas descobertas da pesquisa.
- Devem ser numeradas e no máximo cinco.

Agradecimentos

- A palavra **Agradecimentos** deve ser centralizada e grafada em negrito, com letras minúsculas, exceto a letra inicial.
- Devem ser breves e diretos, iniciando-se com “Ao, Aos, À ou Às” (pessoas ou instituições).
- Devem conter o motivo do agradecimento.

Referências

- A palavra *Referências* deve ser centralizada e grafada em negrito, com letras minúsculas, exceto a letra inicial.
- Devem ser de fontes atuais e de periódicos: pelo menos 70% das referências devem ser dos últimos 10 anos e 70% de artigos de periódicos.
- Devem ser normalizadas de acordo com a NBR 6023 da ABNT, com as adaptações descritas a seguir.
- Devem ser apresentadas em ordem alfabética dos nomes dos autores, separados por ponto-e-vírgula, sem numeração.
- Devem apresentar os nomes de todos os autores da obra.
- Devem conter os títulos das obras ou dos periódicos grafados em negrito.
- Devem conter somente a obra consultada, no caso de citação de citação.
- Todas as referências devem registrar uma data de publicação, mesmo que aproximada.
- Devem ser trinta, no máximo.

Exemplos:

- Artigos de Anais de Eventos (aceitos apenas trabalhos completos)

AHRENS, S. A fauna silvestre e o manejo sustentável de ecossistemas florestais. In: SIMPÓSIO LATINO-AMERICANO SOBRE MANEJO FLORESTAL, 3., 2004, Santa Maria. **Anais**. Santa Maria: UFSM, Programa de Pós-Graduação em Engenharia Florestal, 2004. p.153-162.

- Artigos de periódicos

SANTOS, M.A. dos; NICOLÁS, M.F.; HUNGRIA, M. Identificação de QTL associados à simbiose entre *Bradyrhizobium japonicum*, *B. elkanii* e soja. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.41, p.67-75, 2006.

- Capítulos de livros

AZEVEDO, D.M.P. de; NÓBREGA, L.B. da; LIMA, E.F.; BATISTA, F.A.S.; BELTRÃO, N.E. de M. Manejo cultural. In: AZEVEDO, D.M.P.; LIMA, E.F. (Ed.). **O agronegócio da mamona no Brasil**. Campina Grande: Embrapa Algodão; Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2001. p.121-160.

- Livros

OTSUBO, A.A.; LORENZI, J.O. **Cultivo da mandioca na Região Centro-Sul do Brasil**. Dourados: Embrapa Agropecuária Oeste; Cruz das Almas: Embrapa Mandioca e Fruticultura, 2004. 116p. (Embrapa Agropecuária Oeste. Sistemas de produção, 6).

- Teses

HAMADA, E. **Desenvolvimento fenológico do trigo (cultivar IAC 24 - Tucuruí), comportamento espectral e utilização de imagens NOAA-AVHRR**. 2000. 152p. Tese (Doutorado) - Universidade Estadual de Campinas, Campinas.

- Fontes eletrônicas

EMBRAPA AGROPECUÁRIA OESTE. **Avaliação dos impactos econômicos, sociais e ambientais da pesquisa da Embrapa Agropecuária Oeste**: relatório do ano de 2003. Dourados: Embrapa Agropecuária Oeste, 2004. 97p. (Embrapa Agropecuária Oeste. Documentos, 66). Disponível em: . Acesso em: 18 abr. 2006.

Tabelas

- As tabelas devem ser numeradas seqüencialmente, com algarismo arábico, e apresentadas em folhas separadas, no final do texto, após as referências.

- Devem ser auto-explicativas.

- Seus elementos essenciais são: título, cabeçalho, corpo (colunas e linhas) e coluna indicadora dos tratamentos ou das variáveis.

- Os elementos complementares são: notas-de-rodapé e fontes bibliográficas.

- O título, com ponto no final, deve ser precedido da palavra Tabela, em negrito; deve ser claro, conciso e completo; deve incluir o nome (vulgar ou científico) da espécie e das variáveis dependentes.

- No cabeçalho, os nomes das variáveis que representam o conteúdo de cada coluna devem ser grafados por extenso; se isso não for possível, explicar o significado das abreviaturas no título ou nas notas-de-rodapé.

- Todas as unidades de medida devem ser apresentadas segundo o Sistema Internacional de Unidades.
- Nas colunas de dados, os valores numéricos devem ser alinhados pelo último algarismo.
- Nenhuma célula (cruzamento de linha com coluna) deve ficar vazia no corpo da tabela; dados não apresentados devem ser representados por hífen, com uma nota-de-rodapé explicativa.
- Na comparação de médias de tratamentos são utilizadas, no corpo da tabela, na coluna ou na linha, à direita do dado, letras minúsculas ou maiúsculas, com a indicação em nota-de-rodapé do teste utilizado e a probabilidade.
- Devem ser usados fios horizontais para separar o cabeçalho do título, e do corpo; usá-los ainda na base da tabela, para separar o conteúdo dos elementos complementares. Fios horizontais adicionais podem ser usados dentro do cabeçalho e do corpo; não usar fios verticais.
- As tabelas devem ser editadas em arquivo Word, usando os recursos do menu Tabela; não fazer espaçamento utilizando a barra de espaço do teclado, mas o recurso recuo do menu Formatar Parágrafo.
- Notas de rodapé das tabelas
- Notas de fonte: indicam a origem dos dados que constam da tabela; as fontes devem constar nas referências.
- Notas de chamada: são informações de caráter específico sobre partes da tabela, para conceituar dados. São indicadas em algarismo arábico, na forma de expoente, entre parênteses, à direita da palavra ou do número, no título, no cabeçalho, no corpo ou na coluna indicadora. São apresentadas de forma contínua, sem mudança de linha, separadas por ponto.
- Para indicação de significância estatística, são utilizadas, no corpo da tabela, na forma de expoente, à direita do dado, as chamadas ns (não-significativo); * e ** (significativo a 5 e 1% de probabilidade, respectivamente).

Figuras

- São consideradas figuras: gráficos, desenhos, mapas e fotografias usados para ilustrar o texto.
- Só devem acompanhar o texto quando forem absolutamente necessárias à documentação dos fatos descritos.
- O título da figura, sem negrito, deve ser precedido da palavra Figura, do número em algarismo arábico, e do ponto, em negrito.
- Devem ser auto-explicativas.

- A legenda (chave das convenções adotadas) deve ser incluída no corpo da figura, no título, ou entre a figura e o título.
- Nos gráficos, as designações das variáveis dos eixos X e Y devem ter iniciais maiúsculas, e devem ser seguidas das unidades entre parênteses.
- Figuras não-originais devem conter, após o título, a fonte de onde foram extraídas; as fontes devem ser referenciadas.
- O crédito para o autor de fotografias é obrigatório, como também é obrigatório o crédito para o autor de desenhos e gráficos que tenham exigido ação criativa em sua elaboração. - As unidades, a fonte (Times New Roman) e o corpo das letras em todas as figuras devem ser padronizados.
- Os pontos das curvas devem ser representados por marcadores contrastantes, como: círculo, quadrado, triângulo ou losango (cheios ou vazios).
- Os números que representam as grandezas e respectivas marcas devem ficar fora do quadrante.
- As curvas devem ser identificadas na própria figura, evitando o excesso de informações que comprometa o entendimento do gráfico.
- Devem ser elaboradas de forma a apresentar qualidade necessária à boa reprodução gráfica e medir 8,5 ou 17,5 cm de largura.
- Devem ser gravadas nos programas Word, Excel ou Corel Draw, para possibilitar a edição em possíveis correções.
- Usar fios com, no mínimo, 3/4 ponto de espessura.
- No caso de gráfico de barras e colunas, usar escala de cinza (exemplo: 0, 25, 50, 75 e 100%, para cinco variáveis).
- Não usar negrito nas figuras.
- As figuras na forma de fotografias devem ter resolução de, no mínimo, 300 dpi e ser gravadas em arquivos extensão TIF, separados do arquivo do texto.
- Evitar usar cores nas figuras; as fotografias, porém, podem ser coloridas.

Outras informações

- Não há cobrança de taxa de publicação.
- Os manuscritos aprovados para publicação são revisados por no mínimo dois especialistas.
- O editor e a assessoria científica reservam-se o direito de solicitar modificações nos artigos e de decidir sobre a sua publicação.

- São de exclusiva responsabilidade dos autores as opiniões e conceitos emitidos nos trabalhos.

- Os trabalhos aceitos não podem ser reproduzidos, mesmo parcialmente, sem o consentimento expresso do editor da PAB.

Contatos com a secretaria da revista podem ser feitos por telefone: (61)3448-4231, via e-mail: sct.pab@embrapa.br ou pelos correios:

Embrapa Informação Tecnológica Pesquisa Agropecuária Brasileira – PAB

Caixa Postal 040315 CEP 70770 901 Brasília, DF