



Instituto Politécnico de Castelo Branco  
Escola Superior Agrária

**Relatório de Estágio**

**Análises microbiológicas de leites, queijos,  
manipuladores e superfícies**

**Marta Cordeiro Zagalo das Neves  
Engenharia Biológica e Alimentar**

**Orientador Interno: Dr<sup>a</sup>. Cristina Pintado  
Orientador Externo: Prof. Dr. Pedro Rocha**

**Castelo Branco, Novembro 2009**

**Resumo**

Neste trabalho foram analisadas as amostras provenientes de duas queijarias relativamente aos parâmetros microbiológicos *Escherichia coli*, coliformes totais, *Staphylococcus* coagulase-positiva, *Salmonella* spp., *Listeria monocytogenes*, *Enterobacteriaceae* e microrganismos totais a 30°C. As amostras analisadas foram queijos, leites, superfícies e manipuladores.

Para além da realização das análises microbiológicas, foram ainda recolhidos 110 registos de resultados de análises da queijaria A e 55 registos de resultados de análises da queijaria B.

De uma maneira geral, os resultados obtidos foram satisfatórios nos leites e nos queijos. Nos manipuladores os resultados obtidos foram todos satisfatórios, obtendo-se ausência de todos os microrganismos analisados.

Nas superfícies analisadas obteve-se uma percentagem de 2,8% de superfícies duvidosas e 11,1% de superfícies sujas considerando os microrganismos totais a 30°C, e 88,9% de valores insatisfatórios para as *Enterobacteriaceae* na queijaria A. Na queijaria B verificou-se 15% de limpeza duvidosa e 20% de superfícies sujas na avaliação feita com base na contagem de microrganismos totais a 30°C. Os resultados obtidos para a pesquisa de *Listeria monocytogenes* foram todos satisfatórios.

A maioria dos resultados insatisfatórios devem-se a uma possível falta de higiene na recolha do leite, durante a sua transformação em queijo e/ou através do contacto com superfícies e manipuladores que não respeitam as boas práticas de higiene.

**Palavras-chave:** análise microbiológica, lacticínios, microrganismos, higiene.

**Abstract**

In this work, were analyzed samples from two cheese dairy industries in relation to the microbiological parameters *Escherichia coli*, total coliforms, coagulase-positive *Staphylococcus*, *Salmonella* spp., *Listeria monocytogenes*, *Enterobacteriaceae* and total microorganisms at 30°C. The analyzed samples included cheeses, milk, surfaces and manipulators.

About 110 results of analysis had been collected from cheese dairy industry A and 55 from cheese dairy industry B.

In a general way, the results had been satisfactory in milk and cheese samples. Concerning the manipulators, the results had been all satisfactory, getting absence in all the analyzed microorganisms.

After surface analysis we had 2,8% of suspicious areas, and 11,1% of dirty areas concerning the microorganisms at 30°C, and 88,9% of the surfaces not satisfactory to the *Enterobacteriaceae* at the cheese dairy industry A. On cheese dairy industry B we verified 15% of suspicious cleaning and 20% of dirty surfaces concerning the total microorganisms at 30°C. The results of the *Listeria monocytogenes* detection were all satisfactory.

The great part of the unsatisfactory results maybe the a possible lack of higienazation on the milk gathering, during cheese making and/or thought the contact with surfaces and manipulators which don` t respect the good hygienic practices.

**Key words:** microbiological analysis, dairy products, microorganisms, hygiene

## Índice

RESUMO.....	I
ABSTRACT.....	II
ÍNDICE.....	III
ÍNDICE DE FIGURAS.....	V
ÍNDICE DE TABELAS.....	VI
<b>1 – INTRODUÇÃO.....</b>	<b>1</b>
<b>2 – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....</b>	<b>2</b>
2.1 – LEITE.....	2
2.2 – QUEIJO.....	3
2.3 - CONTROLO MICROBIOLÓGICO DOS MANIPULADORES E DO AMBIENTE.....	4
2.4 – CARACTERÍSTICAS DOS MICRORGANISMOS ANALISADOS.....	6
2.4.1 – Coliformes totais.....	6
2.4.2 – <i>Enterobacteriaceae</i> .....	6
2.4.3 – <i>Escherichia coli</i> .....	7
2.4.4 – <i>Salmonella</i> spp.....	7
2.4.5 – <i>Listeria monocytogenes</i> .....	8
2.4.6 – Microrganismos totais a 30°C.....	9
2.4.7 – <i>Staphylococcus</i> coagulase-positiva.....	9
<b>3 – MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>10</b>
3.1 – CARACTERIZAÇÃO DA EMPRESA.....	10
3.2 – ANÁLISES LABORATORIAIS.....	10
3.2.1 - Pesquisa de <i>Salmonella</i> spp. nos queijos.....	11
3.2.2 - Pesquisa de <i>Listeria monocytogenes</i> nos queijos.....	11
3.2.3 - Contagem de <i>Escherichia coli</i> nos queijos.....	12
3.2.4 - Contagem de <i>Staphylococcus</i> coagulase-positiva nos queijos.....	12
3.2.5 - Contagem de microrganismos totais a 30°C no leite.....	13
3.2.6 - Pesquisa de antibióticos no leite – Método Interno.....	13
3.2.7 - Contagem de microrganismos totais a 30°C e <i>Enterobacteriaceae</i> em superfícies.....	13
3.2.8 - Contagem de <i>Staphylococcus</i> coagulase-positiva, <i>Escherichia coli</i> e coliformes totais em manipuladores.....	14
<b>4 – RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>15</b>
4.1 – CRITÉRIOS USADOS NA ANÁLISE DOS RESULTADOS.....	15
4.2 – LEITE.....	17
4.3 – REQUEIJÃO.....	19
4.4 – QUEIJOS.....	21
4.4.1 – Queijo de ovelha de meia cura.....	21
4.4.2 - Queijo curado seco.....	22
4.4.3 – Queijo de ovelha amanteigado.....	23
4.4.4 - Queijo duro.....	25

4.4.5 – Queijo de cabra .....	27
<b>4.5 – MÃOS DE MANIPULADORES .....</b>	<b>27</b>
<b>4.6 – SUPERFÍCIES .....</b>	<b>29</b>
<b>5 – CONCLUSÃO .....</b>	<b>33</b>
<b>6 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>34</b>

Agradecimentos

**Índice de Figuras**

<b>Figura 1:</b> Higienização das mãos .....	5
<b>Figura 2:</b> Localização relativa dos coliformes, coliformes fecais e <i>Escherichia coli</i> na grande família <i>Enterobacteriaceae</i> .....	6
<b>Figura 3:</b> Percentagem de amostras superficiais consideradas limpas, sujas ou com limpeza duvidosa, tendo em conta o número de microrganismos totais a 30°C, na queijaria A.....	29
<b>Figura 4:</b> Percentagem de amostras superficiais com resultados satisfatórios ou insatisfatórios, considerando os resultados de <i>Enterobacteriaceae</i> na queijaria A. ....	30
<b>Figura 5:</b> Percentagem de amostras superficiais consideradas limpas, sujas ou com limpeza duvidosa, tendo em conta o número de microrganismos totais a 30°C, na queijaria B.....	30

**Índice de Tabelas**

<b>Tabela 1:</b> Número de amostras analisadas nas queijarias A e B.....	11
<b>Tabela 2:</b> Valores para a avaliação microbiológica dos leites, segundo os critérios definidos no Directiva 92/46/CEE e Regulamento (CE) 853/2004).....	15
<b>Tabela 3:</b> Valores usados na apreciação dos resultados após análise microbiológica dos queijos.....	16
<b>Tabela 4:</b> Valores para a avaliação microbiológica de superfícies e mãos de manipuladores.....	17
<b>Tabela 5:</b> Resultados obtidos das análises ao leite.....	18
<b>Tabela 6:</b> Resultados obtidos na análise ao requeijão.....	20
<b>Tabela 7:</b> Resultados obtidos na análise ao queijo de ovelha de meia cura.....	21
<b>Tabela 8:</b> Resultados obtidos para o queijo curado seco .....	22
<b>Tabela 9:</b> Resultados obtidos da análise às amostras de queijo de ovelha amanteigado.....	24
<b>Tabela 10:</b> Resultados obtidos da análise ao queijo duro .....	25
<b>Tabela 11:</b> Resultados obtidos na análise ao queijo de cabra .....	27
<b>Tabela 12:</b> Resultados das análises efectuadas aos manipuladores na queijaria A.....	28
<b>Tabela 13:</b> Resultados das análises efectuadas aos manipuladores na queijaria B.....	28
<b>Tabela 14:</b> Resultados relativos às análises efectuadas a superfícies na queijaria B.....	31

## 1 – INTRODUÇÃO

O ramo da microbiologia que se dedica especialmente ao estudo das relações entre os microrganismos e os alimentos denomina-se Microbiologia Alimentar.

Entre todos os tipos de microrganismos que interagem nos alimentos, as bactérias formam o grupo mais importante, tanto pelo número como pela diversidade e frequência das suas acções (Lacasse, 1995).

A análise microbiológica dos alimentos responde a dois objectivos: 1 - Controlar a qualidade microbiológica geral dos géneros alimentícios (trata-se de efectuar testes para verificar o alcance da contaminação dos alimentos, a eficácia das boas práticas de fabrico, a higiene que envolve a sua manipulação, as suas condições de armazenagem e a sua salubridade); 2 - Detectar a presença de microrganismos patogénicos ou de toxinas susceptíveis de causarem toxinfecções alimentares.

Os alimentos são um dos meios de transmissão de agentes patogénicos, sendo hoje em dia um dos grandes problemas de saúde da nossa sociedade.

As bactérias encontram-se praticamente em todo o lado, mas podem estar especialmente em superfícies, operadores e animais. Quando as bactérias são transferidas destas fontes para os alimentos estes ficam contaminados. As bactérias multiplicam-se rapidamente aumentando assim a probabilidade de provocar toxinfecções alimentares (Rocha, 2007).

Alguns microrganismos são acrescentados durante as diferentes manipulações a que são submetidos os alimentos antes do seu consumo. Com efeito, os equipamentos e os utensílios que entram em contacto com os alimentos, assim como o pessoal que os manipula, originam uma contaminação adicional, aumentando o número total de germes (Lacasse, 1995).

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório Brito Rocha LDA, Grupo Clinálise, na área de Análises Microbiológicas de Águas, Produtos Alimentares e Ambiental, no período de Outubro a Maio do corrente ano, tendo como principais objectivos a integração nas rotinas do laboratório, bem como analisar os resultados relativos à contagem ou pesquisa de diferentes microrganismos em amostras de leite, queijo, superfícies e manipuladores de duas queijarias.

## **2 – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

### **2.1 – LEITE**

Por definição, o leite é o líquido segregado pelas glândulas mamárias de uma fêmea leiteira sadia, bem nutrida, não fatigada, mantida em boas condições de higiene, sendo obtido com asseio numa ou mais ordenhas, completas e ininterruptas, livre de substâncias estranhas e isento de colostro (Sanchez, 2004).

A composição do leite, seja qual for a espécie de onde provém, é caracterizada pela sua extrema complexidade, sendo constituído principalmente por proteínas, gordura, lactose, sais minerais e biocatalisadores.

A qualidade do leite pode ser avaliada sob diversos aspectos, de uma maneira geral inseparáveis uns dos outros. A qualidade higiénica é de todas a mais exigente, a mais necessária, pois é ela que pode, por si só, reprovar o leite para qualquer fim.

É praticamente impossível obter-se um leite livre de microrganismos contaminantes. Por isso se definem números aceitáveis, com base nas alterações que esses números causam no leite e derivados. Este factor é muito importante para a avaliação da qualidade do leite cru, pois será indicador das condições de higiene em que o leite foi obtido e armazenado, desde o processo de ordenha até ao consumo (Brito e Brito, s.d).

Quando o leite é retirado de um animal saudável e em condições de higiene muito boas, contém poucos microrganismos. Trata-se essencialmente de bactérias da flora normal do úbera dos animais. Durante a ordenha, o transporte e o acondicionamento, o leite é contaminado por uma grande variedade de microrganismos (Lacasse, 1995).

As análises microbiológicas ao leite proporcionam dados muito úteis que reflectem as condições em que este se obteve e manteve conservado. A obtenção de um grande número de colónias bacterianas não significa necessariamente que o leite contenha patogéneos, mas sim que houve uma grande contaminação ou temperatura de refrigeração e tratamentos incorrectos (Lacasse, 1995).

A qualidade microbiológica do leite é importante sob o ponto de vista sanitário, uma vez que pode ser veículo de transmissão de microrganismos patogénicos.

No entanto, a presença no leite de microrganismos não patogénicos também pode causar danos sob o ponto de vista tecnológico e económico. Estes microrganismos podem causar alterações que comprometem a aptidão do leite, quer para consumo directo quer para ser transformado em derivados (Canada *et al*, 2008).

## 2.2 – QUEIJO

Os queijos são alimentos fundamentais para uma vida saudável. Derivados do leite, são alimentos ricos em proteínas de alto valor biológico, em cálcio, fósforo, zinco, iodo, selénio, vitaminas e oligoelementos.

O queijo é a forma mais antiga de conservação do leite. A extracção de uma parte da água contida no leite durante o fabrico do queijo fornece um produto mais concentrado e mais facilmente conservado do que o leite fermentado.

Existem no mundo mais de 2000 variedades de queijo, variedades essas que derivam apenas de vinte tipos.

As características do leite utilizado, as modalidades técnicas de preparo e os tipos de microrganismos que intervêm na maturação são todos factores determinantes que modificam a textura, a consistência, o sabor e o aroma do queijo (Lacasse, 1995).

O queijo é o produto fresco ou curado, sólido ou semi-sólido, que se obtém:

- a) pela coagulação do leite, leite desnatado, leite parcialmente desnatado, nata, nata de soro ou soro de leite coalhado, isolados ou combinados, graças à acção do coalho ou de outros agentes coagulantes apropriados e por escoamento parcial do soro resultante desta coagulação, ou
- b) pelo emprego de técnicas de fabricação conduzindo à coagulação do leite e/ou das matérias provenientes do leite, de forma a obter-se um produto acabado, possuindo as mesmas características físicas, químicas e organolépticas essenciais do produto definido no parágrafo a) (Eck, s.d).

No que respeita ao controlo de qualidade dos queijos, os defeitos que estes poderão ter são devidos ao leite, à má higiene ou à técnica (Barbosa e Sá, 1990).

### **2.3 - CONTROLO MICROBIOLÓGICO DOS MANIPULADORES E DO AMBIENTE**

Para o fabrico de um produto alimentar de boa qualidade microbiológica, é indispensável controlar a eficácia da limpeza e da desinfeção das superfícies de trabalho e dos equipamentos. Há que ter cuidado também com a qualidade do ar nos locais de trabalho, com a qualidade da água utilizada, bem como com a saúde e a higiene do pessoal que manipula os alimentos (Lacasse, 1995).

As pessoas são uma fonte significativa de bactérias que provocam contaminações alimentares. Para o manipulador de alimentos é fundamental a higiene das mãos, já que são estas que entram em contacto com os alimentos e podem transmitir-lhe microrganismos. A correcta lavagem das mãos é uma das principais regras de higiene que permite evitar o aparecimento de doenças de origem alimentar. É por isto que se torna importante analisar as mãos das pessoas que manipulam alimentos.

A lavagem e desinfeção das mãos devem ser frequentes e efectuadas de uma forma completa, seguindo os passos abaixo indicados:

- Num lavatório próprio, de preferência com torneira de activação não manual, molhar as mãos e antebraços com água corrente, quente e potável.
- Ensaboar bem as mãos e os antebraços com sabão líquido, durante 15 segundos no mínimo, dando especial atenção aos espaços entre os dedos, costas das mãos, polegar e unhas.
- Limpar as unhas com uma escova própria, que se deve limpar e deixar secar após utilização.
- Passar por água corrente para remover todo o sabão.
- Secar com toalhetes de papel descartável, de utilização única.
- Colocar nas mãos a solução desinfectante e esfregá-las bem, deixando secar ao ar.

De acordo com *Center for Diseases Control* (CDC, s.d.), a lavagem das mãos é a forma mais eficaz de prevenir a transmissão de doenças infecciosas.



**Figura 1: Higienização das mãos**  
(Fonte: Anónimo, 2007).

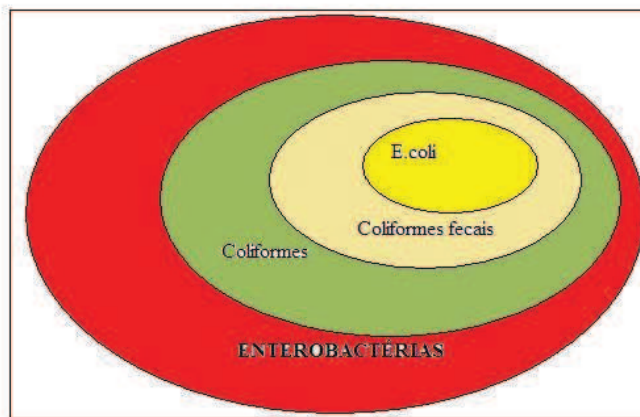
As diferentes superfícies com as quais os alimentos entram em contacto (equipamentos, recipientes e superfícies de trabalho) podem ser uma fonte significativa de contaminação. O equipamento e as superfícies de trabalho devem portanto ser cuidadosamente limpas para eliminar o máximo de resíduos alimentares, e a seguir desinfectados para reduzir a população microbiana presente (Lacasse, 1995).

A higienização deve realizar-se seguindo todos os procedimentos, de forma a não prejudicar a saúde dos manipuladores e não pôr em risco a segurança dos alimentos e dos consumidores (Rocha, 2007).

## 2.4 – CARACTERÍSTICAS DOS MICRORGANISMOS ANALISADOS

### 2.4.1 – Coliformes totais

Os coliformes totais correspondem às enterobactérias que apresentam a particularidade de fermentar a lactose produzindo gases em determinadas condições.



**Figura 2: Localização relativa dos coliformes, coliformes fecais e *Escherichia coli* na grande família *Enterobacteriaceae*.**

(Fonte: Lacasse, 1995)

### 2.4.2 – *Enterobacteriaceae*

São um grupo heterogêneo de bactérias. Uma família que inclui numerosos gêneros: *Escherichia*, *Shigella*, *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Serratia*, *Proteus*, entre outros.

São bacilos Gram negativos, aeróbias ou anaeróbias facultativas, móveis com flagelos peritricos ou imóveis.

São fermentadoras da glucose, catalase positiva e oxidase negativa. Têm uma estrutura antigénica complexa, produzem toxinas e outros factores de virulência e têm uma distribuição ubiqüitária (Lacasse, 1995).

A identificação das estirpes é feita habitualmente, segundo critérios bioquímicos, por métodos convencionais (meios de cultura em tubo) ou por métodos semi-automáticos (sistema API ou outros) (Sousa, 2000).

### 2.4.3 – *Escherichia coli*

O género *Escherichia* caracteriza-se por apresentar bacilos Gram negativos, anaeróbios facultativos, da família *Enterobacteriaceae* e do grupo dos coliformes (fermentam a lactose produzindo gás). A principal espécie, *E.coli*, é sem dúvida a mais estudada de todas as bactérias. É um representante importante da flora intestinal dos humanos e de um grande número de animais de sangue quente. É usada como indicador da qualidade higiénica das matérias-primas. Por esta razão, esta espécie é pesquisada nos alimentos e na água como indicadora de contaminação fecal (Lacasse, 1995).

Existem 5 espécies do género *Escherichia*: *E. coli*, *E. fergusonii*, *E. hermannii*, *E. vulneris*, *E. blattae* (Sousa, 2000).

A *E.coli* divide-se em vários grupos de acordo com a sua virulência (Sousa, 2000).

Estirpes de *E. coli* enteropatogénicas (EPEC)

Estirpes de *E. coli* enterotoxigénicas (ETEC)

Estirpes de *E. coli* enteroagregativo (EAaggEC)

Estirpes de *E. coli* enterohemorrágicas (EHEC)

Estirpes de *E. coli* enteroinvasivas (EIEC)

Estirpes de *E. coli* aderente e difusivo (DAEC)

Estirpes de *E. coli* verocitotoxigénico (VTEC)

Estirpes de *E. coli* produtores de toxina Shiga (STEC).

A presença de *E. coli* indica muitas vezes faltas de higiene no manuseamento durante o processo de fabrico e selecção de matérias-primas de fraca qualidade.

### 2.4.4 – *Salmonella* spp.

*Salmonella* spp. é da família *Enterobacteriaceae*, são bacilos Gram negativos, anaeróbios facultativos, não formadoras de esporos e mobilidade variável.

Têm catalase positiva, glucose positiva (com ou sem gás), manitol positivo e algumas formam H<sub>2</sub>S havendo algumas negativas. *Salmonella* spp. têm oxidase, urease, lactose e sacarose negativa.

O habitat normal das bactérias do género *Salmonella* é o tubo digestivo dos humanos e dos animais, mas estão amplamente disseminadas na natureza a partir das matérias fecais (esgoto, solo, água, alimentos para o consumo humano e animal). São todos patogêneos entéricos, tanto para os humanos como para os animais. Existe apenas uma única espécie, dividida no entanto num enorme número de subespécies e serotipos.

Algumas estirpes, especialmente virulentas, são responsáveis pela febre tifóide, as outras provocam gastroenterites severas transmitidas pela água e os alimentos de origem animal (Lacasse, 1995).

Segundo o regulamento (CE) 1441/2007 de 5 de Dezembro de 2007, deve estar ausente em 25g de produto pois é considerado um microrganismo patogénico.

#### **2.4.5 – *Listeria monocytogenes***

Estas bactérias são bacilos Gram positivos, anaeróbios facultativos, em forma de bastonete curto, móvel por flagelos (a 25°C apresentam mobilidade “tumbling” mas são imóveis a 35°C), produzem ácido mas não gás a partir de hidratos de carbono. Têm catalase positiva, oxidase negativa e são não esporulados.

*Listeria monocytogenes* é uma das bactérias saprozoonóticas que nas últimas décadas tem sido, frequentemente, incriminada em surtos e casos de doenças graves em humanos, quase sempre associados à ingestão de alimentos contaminados (Guerra e Bernardo, 1999b).

Apesar de em Portugal a ocorrência natural de *L.monocytogenes* em leites, queijos ou noutros produtos lácticos transformados ou com fracção láctea não estar suficientemente estudada (Guerra e Bernardo, 1999b), vários estudos apontam para uma elevada prevalência nestes produtos. Assim, esta bactéria foi isolada em 30,1% de amostras de queijo fresco (Duarte, 1992), em 46% de queijo de ovelha curado (Pintado, 1996; Pintado 2005), em 11,8% de queijo de pasta dura ou semi-dura (Guerra e Bernardo, 1999a), em 5 de 7 lotes de queijo de Nisa (Matias e Pintado, 1999), em 6,4% de leite cru de ovelha (Pereira e Pintado, 2000), em 2,0% de leite de ovelha e cabra (Guerra e Bernardo, 1999b), em 6,3% de leite cru de ovelha (Filipe e Pintado, 2002), em 5,6% de leite cru de vaca (Guerra e Bernardo, 1999b) e em 16,7% de leite cru de vaca (Mena *et al.*, 2002).

A presença de *Listeria monocytogenes* no queijo é atribuída ao facto de estes serem muitas vezes fabricados com leite cru ou leite submetido a um tratamento térmico equivalente a uma pasteurização baixa, permitindo a respectiva sobrevivência, ou, ainda, a contaminação pós-pasteurização (Zottola & Smith, 1991, cit. por Guerra e Bernardo, 2001).

Segundo o regulamento (CE) 1441/2007 de 5 de Dezembro de 2007, deve estar ausente em 25g de produto pois é considerado um microrganismo patogénico.

#### **2.4.6 – Microrganismos totais a 30°C**

São bactérias, bolores e leveduras que crescem à temperatura de 30°C num meio de cultura adequado.

Consideramos os microrganismos totais a 30°C indicadores de qualidade de excelência, porque a maioria dos microrganismos crescem a esta temperatura.

#### **2.4.7 – *Staphylococcus coagulase-positiva***

O género *Staphylococcus* pertence à família *Micrococcaceae* e é constituído por mais de 30 espécies. São cocos Gram +, catalase +, coagulase + (Lacasse, 1995). Uma das espécies, *Staphylococcus aureus*, é patogénica.

Esta bactéria é importante na alimentação porque provoca frequentes intoxicações alimentares.

A contaminação por *S. aureus* tem duas origens: animal e humana. Na primeira via, são as mamites a principal causa de contaminação de leite cru por *S. aureus*. Na população humana um grande número de indivíduos são portadores sãos de *S. aureus* na flora nasal, o que contribui para a contaminação dos alimentos.

A presença de *S. aureus* indica muitas vezes falta de higiene no manuseamento durante o processo de fabrico e selecção de matérias-primas de fraca qualidade. Caso se detectem valores  $> 10^5$  ufc/g, o lote de queijo deve ser testado para detecção de enterotoxinas estafilocócicas, segundo o regulamento CE 1441/2007, de 5 de Dezembro de 2007.

### **3 – MATERIAL E MÉTODOS**

#### **3.1 – Caracterização da empresa**

O Laboratório Brito Rocha Lda. é um laboratório certificado segundo a Norma NP EN ISO 9001:2000. A área de Microbiologia Ambiental, Alimentar e Águas está certificado segundo a Norma NP EN ISO 9001:2000 e em processo de acreditação pela Norma NP EN ISO/IEC 17025:2000.

Todas as análises seguem as normas Portuguesas, Comunitárias, Europeias e/ou Internacionais, de acordo com as técnicas e metodologias usadas para cada uso em particular. Em alguns casos, poderão seguir-se métodos internos, devidamente fundamentados.

Foi feito o acompanhamento das análises microbiológicas em rotina no laboratório. Foi também efectuada uma análise dos resultados existentes na empresa em relação a amostras provenientes de duas queijarias: leite, queijo, manipuladores e superfícies.

#### **3.2 – Análises laboratoriais**

As amostras analisadas no laboratório em questão foram colhidas de duas queijarias diferentes, durante o período de Outubro de 2008 a Maio de 2009, sendo apenas possível apresentar os resultados de Janeiro até Junho de 2009, uma vez que o sistema informático não permitiu retirar resultados relativos ao ano de 2008. Foi feito o acompanhamento das duas queijarias, analisando leites, queijos, superfícies e mãos de manipuladores (tabela 1).

O acondicionamento das amostras foi feito em condições estéreis e refrigeradas desde a colheita até à chegada ao laboratório, sendo as análises microbiológicas feitas aos produtos num período máximo de 24H.

É importante referir que a legislação diz que devem ser retiradas cinco amostras de cada produto para análise mas como poderemos ver mais à frente nos resultados, ambas as queijarias não respeitam a legislação.

**Tabela 1: Número de amostras analisadas nas queijarias A e B**

<b>Tipo de amostra</b>	<b>Queijaria A</b>	<b>Queijaria B</b>
<b>Leite</b>	11	6
<b>Queijo</b>	58	19
<b>Superfícies</b>	36	20
<b>Mãos de manipuladores</b>	5	10
<b>Total</b>	110	55

De seguida são descritas todas as etapas pelas quais os produtos passam desde que chegam ao laboratório Brito Rocha, LDA até à obtenção dos resultados das análises.

### **3.2.1 - Pesquisa de *Salmonella* spp. nos queijos**

Esta análise foi baseada na norma ISO 6579 (2002).

Para a pesquisa de *Salmonella* spp. nos queijos pesou-se 25g de queijo (massa e casca), adicionou-se 225mL de Água Peptonada Tamponada (meio de pré-enriquecimento) em sacos estéreis e levou-se ao Stomacker para homogeneizar. Colocaram-se os sacos na estufa a 37°C±1°C durante 24h.

Após a incubação retirou-se 0,1mL da suspensão-mãe e colocou-se em 10 ml de Rappaport Vassiliadis Soja (RVS), levando ao banho durante 24h a 41,5°C.

Passado este tempo repicou-se para o meio XLD-4 (Xylose Lysine Deoxycholate Agar, Oxoid), um meio selectivo. As colónias características em XLD-4 são vermelhas com centro negro. Se houver aparecimento deste tipo de colónias, estas são repicadas por esgotamento para o meio PCA (Place Count Agar, Oxoid), que é um meio não selectivo.

Para confirmação faz-se o teste API 32E (bioMérieux).

### **3.2.2 - Pesquisa de *Listeria monocytogenes* nos queijos**

Para a pesquisa de *Listeria monocytogenes* nos queijos pesou-se 10g de queijo e adicionou-se 90mL de meio One Broth-Listeria Base (Oxoid) nos sacos estéreis.

Levou-se ao Stomacker para homogeneizar e colocaram-se os sacos na estufa a  $30^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}$  durante 48h. Após o tempo de incubação retirou-se 1mL do saco para um tubo de ensaio com 10mL de Fraser e durante 5 minutos colocou-se no banho a  $100^{\circ}\text{C}$ .

Deixou-se arrefecer à temperatura ambiente e fez-se o teste VIP. Se o teste VIP der positivo, fazem-se estrias no meio próprio para isolamento de *Listeria* (ALOA, Oxoid). As colónias características são azuis esverdeadas com halo. Caso se confirme o aparecimento destas colónias fazem-se testes bioquímicos para confirmar a presença de *Listeria monocytogenes*.

### 3.2.3 - Contagem de *Escherichia coli* nos queijos

Para a determinação de *E.coli* nos queijos, pesou-se 25g do produto para um saco esterilizado e adicionou-se 225mL de solução de citrato (Merck). Homogeneizou-se no Stomacker, obtendo-se assim a suspensão-mãe ( $10^{-1}$ ).

A partir da suspensão-mãe preparam-se as diluições decimais necessárias.

Posteriormente, procedeu-se à incorporação, transferindo-se 1mL da amostra para a placa de Petri, adicionando-se de seguida a cada placa de Petri  $\pm 15\text{mL}$  do meio de cultura TBX (Tryptone-Bile-Glucuronic, Oxoid), arrefecido à temperatura de  $\pm 45^{\circ}\text{C}$ , e misturou-se cuidadosamente o inóculo. Quando o meio solidifica, a placa vai a incubar invertida durante 24h em estufa a  $44^{\circ}\text{C}$ . As colónias características são azuis esverdeadas. A confirmação da presença de *E.coli* faz-se através do teste de produção de indol.

### 3.2.4 - Contagem de *Staphylococcus coagulase-positiva* nos queijos

Para a determinação de *Staphylococcus coagulase-positiva* nos queijos, pesou-se 25g do produto para um saco esterilizado, adicionou-se 225mL de solução de citrato (Merck), e homogeneizou-se de seguida no Stomacker, obtendo-se assim a suspensão mãe ( $10^{-1}$ ).

A partir da suspensão-mãe prepararam-se as diluições decimais consideradas necessárias. Posteriormente, procedeu-se à sementeira por espalhamento de 0,1mL de inóculo em BP (Baird Parker, Oxoid). Após completa solidificação das placas, estas

foram a incubar invertidas durante 48h na estufa a 37°C. As colónias características são pretas com halo e precipitado. Foi feito o teste da coagulase para confirmação.

### **3.2.5 - Contagem de microrganismos totais a 30°C no leite**

Para a contagem de microrganismos totais no leite retirou-se 1mL da amostra de leite e juntou-se a 9mL de solução de citrato (Merck). Esta suspensão considera-se a primeira diluição decimal ( $10^{-1}$ ).

A partir da suspensão-mãe prepararam-se as diluições decimais consideradas necessárias. Posteriormente, procedeu-se à inoculação de 1mL da diluição  $10^{-2}$  e da diluição  $10^{-4}$  para a placa de Petri, adicionando-se a cada placa de Petri  $\pm$  15mL do meio de cultura MPCA (Milk Plate Count Agar, Oxoid), arrefecido à temperatura de  $\pm$  45°C, e misturou-se cuidadosamente o inóculo. Quando está completa a solidificação das placas, estas vão a incubar invertidas durante 48h em estufa a 30°C.

### **3.2.6 - Pesquisa de antibióticos no leite – Método Interno**

Para a pesquisa de antibióticos fez-se o teste Twin-Sensor de referência BT00660/BT00661 e da marca ZEU-INMUNOTEC S.L, que consiste em colocar 200 $\mu$ L de leite num tubo contendo ambos os receptores e anticorpos fixados a partículas do ouro. Fechou-se bem o tubo, agitou-se, foi a incubar durante 3 minutos a 55°C, retirou-se da estufa e colocou-se em cada tubo uma tira reactiva. Foi novamente a incubar durante 3 minutos a 50°C e comparou-se com o padrão do Kit.

O Twin-Sensor é um teste rápido para a detecção de  $\beta$ -lactâmicos e tetraciclinas no leite.

### **3.2.7 - Contagem de microrganismos totais a 30°C e *Enterobacteriaceae* em superfícies**

Em ambas as queijarias foram feitas colheitas de amostras de superfícies com zaragatoas estéreis que continham solução de Ringer. Depois de efectuadas as zaragatoas semeou-se por incorporação 1mL da amostra em meio PCA (Plate Count Agar, Oxoid) para os microrganismos totais a 30°C e em meio VRBG (Violet Red Bile

Glucose Agar, Oxoid) para a pesquisa de *Enterobacteriaceae*. As placas foram a incubar invertidas a 30°C durante 24/48h.

### **3.2.8 - Contagem de *Staphylococcus* coagulase-positiva, *Escherichia coli* e coliformes totais em manipuladores**

Em ambas as queijarias foram feitas colheitas de amostras de manipuladores com zaragatoas estéreis que continham solução de Ringer. Depois de efectuadas as zaragatoas realizou-se um espalhamento no meio BP (Baird Parker, Oxoid) para a pesquisa de *Staphylococcus* coagulase-positiva, no meio TBX (Tryptona Bile Glucuronídeo, Oxoid) para a *E. coli* e no meio BP (Baird Parker, Oxoid) para os coliformes totais.

As placas foram a incubar invertidas a 37°C para o BP e a 44°C para o meio TBX.

## 4 – RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 – Critérios usados na análise dos resultados

Os resultados que obtivemos foram analisados com base em critérios microbiológicos, os quais se apresentam nas tabelas seguintes (tabelas 2, 3 e 4).

**Tabela 2: Valores para a avaliação microbiológica dos leites, segundo os critérios definidos na Directiva 92/46/CEE e Regulamento (CE) 853/2004.**

Amostras	Microrganismos totais 30°C
Leite cru de vaca destinado ao consumo humano	$< 5,0 \times 10^4$ (UFC/mL)
Leite cru de vaca destinado a processamento	$< 1,0 \times 10^5$ (UFC/mL)
Leite cru de ovino, caprino e búfala (matéria- prima)	$< 5,0 \times 10^5$ (UFC/mL)
Leite cru de ovino, caprino e búfala, destinado ao processamento térmico	$< 1,5 \times 10^6$ (UFC/mL)

**Tabela 3: Valores usados na apreciação dos resultados após análise microbiológica dos queijos.**

<b>Queijos e Requeijão</b>		<i>E. coli</i>	<i>Staphylococcus</i> coagulase-positiva	<i>Salmonella</i> spp.	<i>Listeria monocytogenes</i>
Queijos de pasta mole elaborados com leite tratado termicamente	Pesquisa	-----	-----	Ausência em 25g	Ausência em 25g
	Contagem	$10^2-10^3$	$10^2-10^3$	-----	-----
Queijos feitos com leite cru ou termizado	Pesquisa	-----	-----	Ausência em 25g	Ausência em 25g
	Contagem	$10^3-10^4$	$10^3-10^4$	-----	-----
Queijos frescos e Requeijão	Pesquisa	-----	-----	Ausência em 25g	Ausência em 25g
	Contagem	$10^0-10^1$	$10^1-10^2$	-----	-----

Fonte: Regulamento CE nº1441/2007, CE nº852/2004, Legislação Portuguesa (Decreto-Lei nº 111/2006, Portaria 56/96).

**Tabela 4: Valores para a avaliação microbiológica de superfícies e mãos de manipuladores.**

<b>Superfícies de manipulação alimentar</b>	<b>Microrganismos totais 30°C</b>	<b><i>Enterobacteriaceae</i></b>
<b>Superfície limpa</b>	<10 UFC/cm <sup>2</sup>	0 – <b>Satisfatório</b>
<b>Limpeza duvidosa (medidas preventivas)</b>	11-100 UFC/cm <sup>2</sup>	≥ 1- <b>Insatisfatório</b>
<b>Superfície suja</b>	≥101 UFC/cm <sup>2</sup>	
<b>Loiças e utensílios (lavagem automática)</b>	≤ 1 UFC/cm <sup>2</sup>	

Fonte: Regulamento CE nº852/2004

**Superfícies:** Recomendada a ausência de *Enterobacteriaceae*

**Operadores:** Recomendada a ausência de *Staphylococcus* coagulase-positiva

#### 4.2 – Leite

Na tabela seguinte estão os resultados obtidos das análises ao leite, em ambas as queijarias, mostrando a data de recolha das amostras e os resultados para os microrganismos totais a 30°C e as substâncias inibidoras / antibióticos.

Tabela 5: Resultados obtidos das análises ao leite

Queijaria	Tipo de Leite	Data de colheita da amostra	Microrganismos totais a 30°C (UFC/mL)	Substâncias inibidoras/Antibióticos
A	Leite de ovelha T1	08-01-2009	$3,0 \times 10^5$	Negativo
	Leite de ovelha SP	17-03-2009	$4,3 \times 10^5$	Negativo
	Leite de ovelha Pinhel	17-03-2009	$1,2 \times 10^6$	Negativo
	Leite de ovelha Figueira	17-03-2009	$2,3 \times 10^6$	Negativo
	Leite de ovelha	17-03-2009	$1,5 \times 10^6$	Negativo
	Leite T1	21-04-2009	$5,1 \times 10^3$	Negativo
	Leite T2	21-04-2009	$2,9 \times 10^3$	Negativo
	Leite de ovelha T2	12-05-2009	$2,2 \times 10^5$	Negativo
	Leite de ovelha T4	12-05-2009	$8,9 \times 10^5$	Negativo
	Leite de ovelha T1	02-06-2009	$> 1,0 \times 10^7$	Positivo para tetraciclina
Leite de ovelha T2	02-06-2009	$> 1,0 \times 10^7$	Positivo para tetraciclina	
B	Leite do tanque T1 antes do processamento	17-03-2009	$1,6 \times 10^4$	Negativo
	Leite do tanque T2 antes do processamento	17-03-2009	$2,1 \times 10^4$	Negativo
	Leite do tanque T3 antes do processamento	17-03-2009	$1,4 \times 10^4$	Negativo
	Leite do tanque T1 após armazenagem	17-03-2009	$7,9 \times 10^3$	Negativo
	Leite do tanque T2 após armazenagem	17-03-2009	$7,6 \times 10^3$	Negativo
	Leite do tanque T3 após armazenagem	17-03-2009	$1,3 \times 10^4$	Negativo

Nas análises efectuadas ao leite de ambas as queijarias, como podemos ver na tabela 5 acima apresentada, os resultados da queijaria B em relação ao parâmetro analisado de pesquisa de substâncias inibidoras/antibióticos são melhores do que na queijaria A, visto esta apresentar duas análises em que o resultado para este parâmetro foi positivo para as tetraciclinas e na queijaria B os resultados terem sido negativos para todas as amostras.

A pesquisa de antibióticos no leite é importante porque os resíduos destes medicamentos podem afectar a saúde dos consumidores. A gravidade desta situação depende do tipo de composto presente, do alimento consumido e da quantidade de resíduo presente (Severo, 2006).

Nestes casos os produtores de leite devem ser alertados de forma a respeitarem os períodos de segurança.

Em relação aos resultados obtidos em ambas as queijarias para microrganismos totais a 30°C a maioria dos valores estão dentro dos limites, como podemos comparar com a tabela 2 acima mencionada, com excepção na queijaria A, dos resultados do dia 02-06-2009 para o leite de ovelha que excede os valores limite.

### **4.3 – Requeijão**

Na tabela 6 mostram-se os resultados obtidos ao requeijão em ambas as queijarias. De salientar que em algumas datas de análise são recolhidas cinco amostras, mas na maioria dos casos, e como já foi dito atrás, ambas as queijarias não cumprem a legislação, mandando muitas vezes só uma amostra em vez das cinco como diz a legislação.

Tabela 6: Resultados obtidos na análise ao requeijão

Queijaria	Amostra	Data de colheita da amostra	<i>Escherichia coli</i> (UFC/g)	<i>Staphylococcus coagulase – positiva</i> (UFC/g)	<i>Salmonella</i> spp. (pesquisa)	<i>Listeria monocytogenes</i> (pesquisa)
A	Amostra 1	08-01-2009	<10	<10	Ausência em 25g	Ausência em 25g
	Amostra 1	11-02-2009	<10	<10	Ausência em 25g	Ausência em 25g
	Amostra 1	17-03-2009	<10	<10	Ausência em 25g	Ausência em 25g
	Amostra 1	21-04-2009	<10	<10	Ausência em 25g	Ausência em 25g
	Amostra 2	21-04-2009	<10	<10	Ausência em 25g	Ausência em 25g
	Amostra 3	21-04-2009	<10	<10	Ausência em 25g	Ausência em 25g
	Amostra 4	21-04-2009	<10	<10	Ausência em 25g	Ausência em 25g
	Amostra 5	21-04-2009	<10	<10	Ausência em 25g	Ausência em 25g
	Amostra 1	12-05-2009	<10	<10	Ausência em 25g	Ausência em 25g
	Amostra 2	12-05-2009	<10	<10	Ausência em 25g	Ausência em 25g
	Amostra 3	12-05-2009	<10	<10	Ausência em 25g	Ausência em 25g
	Amostra 4	12-05-2009	<10	<10	Ausência em 25g	Ausência em 25g
	Amostra 5	12-05-2009	<10	<10	Ausência em 25g	Ausência em 25g
	Amostra 1	02-06-2009	<10	<10	Ausência em 25g	Ausência em 25g
	B	Amostra 1	08-01-2009	<10	<10	Ausência em 25g
Amostra 1		11-02-2009	<10	<10	Ausência em 25g	Ausência em 25g
Amostra 1		17-03-2009	<10	<10	Ausência em 25g	Ausência em 25g
Amostra 1		21-04-2009	<10	<10	Ausência em 25g	Ausência em 25g
Amostra 1		12-05-2009	<10	<10	Ausência em 25g	Ausência em 25g
Amostra 1		02-06-2009	<10	<10	Ausência em 25g	Ausência em 25g

Podemos concluir que, em ambas as queijarias, todas as amostras analisadas são consideradas satisfatórias, porque respeitam os critérios utilizados pela instituição para este tipo de produto (Tabela 3). Perante os resultados apresentados, e em relação aos microrganismos patogênicos a segurança alimentar não está posta em causa, visto que houve sempre ausência para a *Listeria monocytogenes* e para a *Salmonella* spp.

#### 4.4 – Queijos

##### 4.4.1 – Queijo de ovelha de meia cura

Na tabela 7 estão apresentados os resultados da análise microbiológica ao queijo de ovelha de meia cura na queijaria A. Não foram realizadas análises a este tipo de queijo na queijaria B.

**Tabela 7: Resultados obtidos na análise ao queijo de ovelha de meia cura**

Queijaria	Amostra	Data de colheita da amostra	<i>Escherichia coli</i> (UFC/g)	<i>Staphylococcus coagulase - positiva</i>	<i>Salmonella</i> spp. (pesquisa)	<i>Listeria monocytogenes</i> (pesquisa)
A	Amostra 1	08-01-2009	<10	<10	Ausência em 25g	Ausência em 25g
	Amostra 1	17-03-2009	<10	<10	Ausência em 25g	Ausência em 25g
	Amostra 1	21-04-2009	<10	<10	Ausência em 25g	Ausência em 25g
	Amostra 1	12-05-2009	<10	<10	Ausência em 25g	Ausência em 25g
	Amostra 1	02-06-2009	<10	<10	Ausência em 25g	Ausência em 25g

Perante os resultados obtidos, conclui-se que todas as amostras têm qualidade satisfatória, pois os seus valores estão dentro dos limites que o laboratório segue (Tabela 3).

Dos resultados obtidos para o queijo de ovelha de meia cura, podemos pensar que todos os procedimentos higiénicos durante o fabrico e conservação, e no uso de matéria-prima de alta qualidade higiénica, foram respeitados.

#### 4.4.2 - Queijo curado seco

Na tabela 8 estão apresentados os resultados obtidos apenas na queijaria A para o queijo curado seco, uma vez que na queijaria B não foram realizadas análises para este tipo de queijo.

**Tabela 8: Resultados obtidos para o queijo curado seco**

Queijaria	Amostra	Data de colheita da amostra	<i>Escherichia coli</i>	<i>Staphylococcus coagulase - positiva</i>	<i>Salmonella</i> spp.	<i>Listeria monocytogenes</i> (pesquisa)
A	Amostra 1	08-01-2009	<10	<10	Ausência em 25g	Ausência em 25g
	Amostra 1	17-03-2009	<10	<10	Ausência em 25g	Ausência em 25g
	Amostra 1	21-04-2009	<10	<10	Ausência em 25g	Ausência em 25g
	Amostra 2	21-04-2009	<10	<10	Ausência em 25g	Ausência em 25g
	Amostra 3	21-04-2009	<10	<10	Ausência em 25g	Ausência em 25g
	Amostra 4	21-04-2009	<10	<10	Ausência em 25g	Ausência em 25g
	Amostra 5	21-04-2009	<10	<10	Ausência em 25g	Ausência em 25g
	Amostra 1	12-05-2009	<10	<10	Ausência em 25g	Ausência em 25g
	Amostra 2	12-05-2009	<10	<10	Ausência em 25g	Ausência em 25g
	Amostra 3	12-05-2009	<10	<10	Ausência em 25g	Ausência em 25g
	Amostra 4	12-05-2009	<10	<10	Ausência em 25g	Ausência em 25g
	Amostra 5	12-05-2009	<10	<10	Ausência em 25g	Ausência em 25g
	Amostra 1	02-06-2009	<10	<10	Ausência em 25g	Ausência em 25g

Perante os resultados obtidos, conclui-se que todas as amostras têm qualidade satisfatória, pois os seus valores estão dentro dos limites que o laboratório segue (Tabela 3). Podemos mais uma vez pensar que, perante os resultados apresentados de acordo com os microrganismos em questão, foram seguidas todas as regras básicas para uma boa higienização do produto. Não há assim risco para o consumidor, pois houve ausência de *Listeria monocytogenes* e *Salmonella* spp. em todas as amostras analisadas.

### **4.4.3 – Queijo de ovelha amanteigado**

Na tabela 9 são apresentados os resultados obtidos das análises efectuadas para o queijo de ovelha amanteigado, tanto na queijaria A como na queijaria B.

**Tabela 9: Resultados obtidos da análise às amostras de queijo de ovelha amanteigado**

Queijaria	Amostra	Data de colheita da amostra	<i>Escherichia coli</i> (UFC/g)	<i>Staphylococcus coagulase – positiva</i>	<i>Salmonella</i> spp.	<i>Listeria monocytogenes</i> (pesquisa)	
A	Amostra 1	08-01-2009	<10	<10	Ausência em 25g	Ausência em 25g	
	Amostra 1	11-02-2009	<10	<10	Ausência em 25g	Ausência em 25g	
	Amostra 1	17-03-2009	<10	<10	Ausência em 25g	Ausência em 25g	
	Amostra 1	21-04-2009	<10	<10	Ausência em 25g	Ausência em 25g	
	Amostra 2	21-04-2009	<10	<10	Ausência em 25g	Ausência em 25g	
	Amostra 3	21-04-2009	<10	<10	Ausência em 25g	Ausência em 25g	
	Amostra 4	21-04-2009	<10	<10	Ausência em 25g	Ausência em 25g	
	Amostra 5	21-04-2009	<10	<10	Ausência em 25g	Ausência em 25g	
	Amostra 1	12-05-2009	2,0×10 <sup>1</sup>	<10	Ausência em 25g	Ausência em 25g	
	Amostra 2	12-05-2009	1,0×10 <sup>1</sup>	<10	Ausência em 25g	Ausência em 25g	
	Amostra 3	12-05-2009	<10	<10	Ausência em 25g	Ausência em 25g	
	Amostra 4	12-05-2009	<10	<10	Ausência em 25g	Ausência em 25g	
	Amostra 5	12-05-2009	1,0×10 <sup>1</sup>	<10	Ausência em 25g	Ausência em 25g	
	B	Amostra 1	08-01-2009	<10	<10	Ausência em 25g	Ausência em 25g
		Amostra 1	11-02-2009	8,0×10 <sup>1</sup>	<10	Ausência em 25g	Ausência em 25g
Amostra 1		17-03-2009	1,9×10 <sup>2</sup>	<10	Ausência em 25g	Ausência em 25g	
Amostra 1		21-04-2009	<10	<10	Ausência em 25g	Ausência em 25g	
Amostra 1		02-06-2009	<10	<10	Ausência em 25g	Ausência em 25g	

Relativamente aos parâmetros analisados, tanto na queijaria A como na queijaria B, consideram-se as amostras satisfatórias. Apesar de existir uma variação de valores para a *E. coli* em ambas as queijarias, os valores estão dentro dos valores seguidos pelo laboratório (Tabela 3).

A presença de *E.coli* nos queijos pode ser devida a uma má higienização durante a ordenha, durante a manipulação dos queijos e/ou higiene inadequada durante a produção (Zaffari, 2005).

#### 4.4.4 - Queijo duro

Na tabela 10 abaixo mencionada estão os resultados obtidos para as análises efectuadas ao queijo duro, na queijaria A e na queijaria B.

**Tabela 10: Resultados obtidos da análise ao queijo duro**

Queijaria	Amostra	Data de colheita da amostra	<i>Escherichia coli</i> (UFC/g)	<i>Staphylococcus coagulase-positiva</i>	<i>Salmonella</i> spp. (pesquisa)	<i>Listeria monocytogenes</i> (pesquisa)
A	Amostra 1	08-01-2009	<10	<10	Ausência em 25g	Ausência em 25g
	Amostra 1	11-02-2009	<10	<10	Ausência em 25g	Ausência em 25g
	Amostra 1	17-03-2009	<10	<10	Ausência em 25g	Ausência em 25g
	Amostra 1	21-04-2009	<10	<10	Ausência em 25g	Ausência em 25g
	Amostra 2	21-04-2009	<10	<10	Ausência em 25g	Ausência em 25g
	Amostra 3	21-04-2009	<10	<10	Ausência em 25g	Ausência em 25g
	Amostra 4	21-04-2009	<10	<10	Ausência em 25g	Ausência em 25g
	Amostra 5	21-04-2009	<10	<10	Ausência em 25g	Ausência em 25g

	Amostra	12-05-			Ausência em	Ausência em
	1	2009	<10	<10	25g	25g
	Amostra	12-05-			Ausência em	Ausência em
	2	2009	<10	<10	25g	25g
	Amostra	12-05-			Ausência em	Ausência em
	3	2009	<10	<10	25g	25g
	Amostra	12-05-			Ausência em	Ausência em
	4	2009	<10	<10	25g	25g
	Amostra	12-05-			Ausência em	Ausência em
	5	2009	<10	<10	25g	25g
<b>B</b>	Amostra	08-01-			Ausência em	Ausência em
	1	2009	<10	<10	25g	25g
	Amostra	11-02-			Ausência em	Ausência em
	1	2009	<10	<10	25g	25g
	Amostra	17-03-			Ausência em	Ausência em
1	2009	$2,2 \times 10^2$	<10	25g	25g	
	Amostra	21-04-			Ausência em	Ausência em
	1	2009	<10	<10	25g	25g
	Amostra	02-06-			Ausência em	Ausência em
	1	2009	<10	<10	25g	25g

Relativamente aos parâmetros analisados em ambas as queijarias consideram-se as amostras satisfatórias, apesar do valor na queijaria B, na data de 17-03-2009, ser de  $2,2 \times 10^2$ . Os queijos duros analisados em ambas as queijarias são fabricados à base de leite cru ou termizado, logo o valor  $2,2 \times 10^2$  é inferior ao limite referido na tabela 3, que é de  $10^3 - 10^4$  UFC/g.

Quando os queijos são fabricados à base de leite cru, estes são mais susceptíveis de conterem maior número de microrganismos. As tetas dos animais quando sujas com matéria fecal, estão na origem da contaminação do leite pela *E. coli* (Eck, s.d).

#### 4.4.5 – Queijo de cabra

Na tabela abaixo, estão apresentados os resultados obtidos das análises efectuadas ao queijo de cabra na queijaria B. Não foram realizadas análises a este produto na queijaria A.

**Tabela 11: Resultados obtidos na análise ao queijo de cabra**

Queijaria	Amostra	Data de colheita da amostra	<i>Escherichia coli</i> (UFC/g)	<i>Staphylococcus coagulase - positiva</i>	<i>Salmonella</i> spp. (pesquisa)	<i>Listeria monocytogenes</i> (pesquisa)
<b>B</b>	Amostra 1	08-01-2009	<10	<10	Ausência	Ausência
	Amostra 1	11-02-2009	5,8×10 <sup>2</sup>	<10	Ausência	Ausência
	Amostra 1	17-03-2009	<10	<10	Ausência	Ausência

Relativamente aos parâmetros analisados na queijaria B, todas as amostras são consideradas satisfatórias.

#### 4.5 – Mãos de manipuladores

Na tabela 12 e 13 abaixo mencionadas estão os resultados obtidos para as análises efectuadas aos manipuladores na queijaria A e na queijaria B.

**Tabela 12: Resultados das análises efectuadas aos manipuladores na queijaria A**

<b>Data de colheita da amostra</b>	<b>Ensaio/Colheita</b>	<b><i>Staphylococcus</i> coagulase positiva (<i>S. aureus</i>) (UFC/cm<sup>2</sup>)</b>
08-01-2009	Mão D. Fernanda	Ausência
08-01-2009	Mão Sr. Manuel	Ausência
17-03-2009	Mão D. Paula	Ausência
21-04-2009	Mão D. Catarina	Ausência
02-06-2009	Mão D. Catarina	Ausência

**Tabela 13: Resultados das análises efectuadas aos manipuladores na queijaria B**

<b>Data de colheita da amostra</b>	<b>Manipuladores</b>	<b><i>Staphylococcus</i> coagulase positiva (<i>S. aureus</i>) (UFC/cm<sup>2</sup>)</b>	<b><i>Escherichia coli</i> (UFC/cm<sup>2</sup>)</b>	<b>Coliformes totais (UFC/cm<sup>2</sup>)</b>
12-05-2009	Operador nº 1	Ausência	Ausência	Ausência
12-05-2009	Operador nº 2	Ausência	Ausência	Ausência
12-05-2009	Operador nº 3	Ausência	Ausência	Ausência
12-05-2009	Operador nº 4	Ausência	Ausência	Ausência
12-05-2009	Operador nº 5	Ausência	Ausência	Ausência
12-05-2009	Operador nº 6	Ausência	Ausência	Ausência
12-05-2009	Operador nº 7	Ausência	Ausência	Ausência
12-05-2009	Operador nº 8	Ausência	Ausência	Ausência
12-05-2009	Operador nº 9	Ausência	Ausência	Ausência
12-05-2009	Operador nº 10	Ausência	Ausência	Ausência

O número total de manipuladores analisados nas duas queijarias foi de 15, sendo 5 da queijaria A e 10 da queijaria B.

Na queijaria A, foi feita a análise microbiológica para pesquisa de *Staphylococcus aureus*, verificando-se ausência deste microrganismo em todas as amostras. Assim, considera-se o resultado satisfatório.

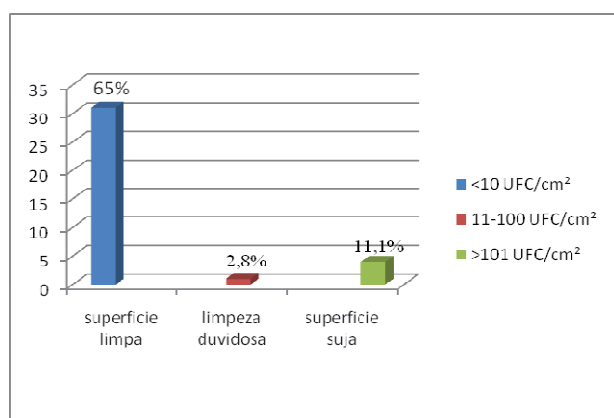
Na queijaria B foi efectuada a pesquisa de *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e coliformes totais, verificando-se ausência dos microrganismos estudados em todas as amostras. Também neste caso se consideram os resultados satisfatórios.

Com os resultados obtidos pode-se concluir que os manipuladores de alimentos usam as técnicas adequadas de higienização, não causando assim perigo para a saúde pública dos consumidores em ambas as queijarias. A higienização das mãos é muito importante, pois o seu principal objectivo é a remoção do maior número de microrganismos.

#### 4.6 – Superfícies

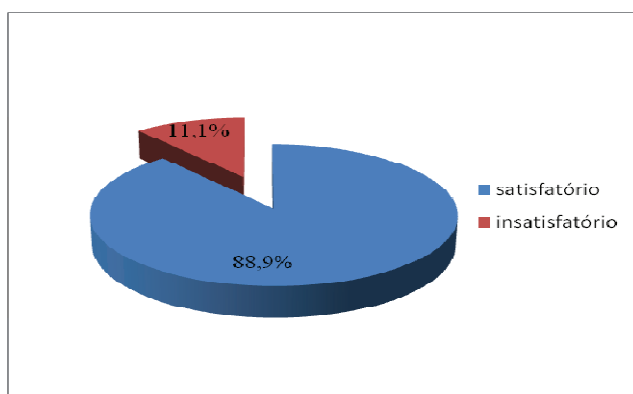
Os seguintes gráficos apresentam os resultados obtidos das análises às superfícies na queijaria A e na queijaria B. Para a queijaria A apresentam-se dois gráficos. O primeiro corresponde à percentagem de amostras superficiais consideradas limpas, sujas ou limpeza duvidosa, tendo em conta os resultados obtidos com a contagem de microrganismos totais a 30°C (figura 3). O segundo gráfico (figura 4) corresponde à percentagem de amostras superficiais com resultados satisfatórios ou insatisfatórios, tendo em conta os resultados obtidos com a contagem de *Enterobacteriaceae* na queijaria A.

Relativamente à queijaria B os resultados efectuados às superfícies encontram-se na figura 5 e na tabela 14.



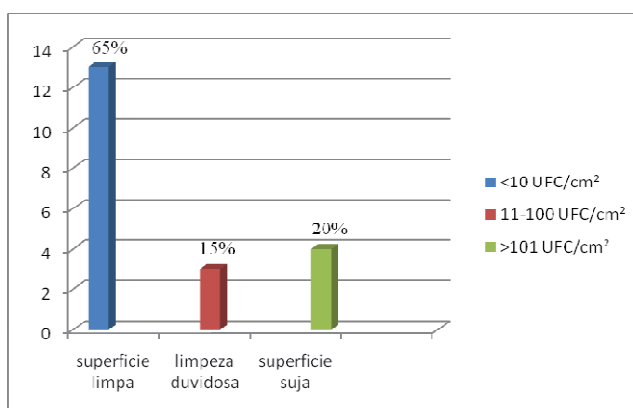
**Figura 3: Percentagem de amostras superficiais consideradas limpas, sujas ou com limpeza duvidosa, tendo em conta o número de microrganismos totais a 30°C, na queijaria A.**

Na queijaria A verificou-se uma maior percentagem de superfícies limpas ao longo do tempo, considerando 65% das amostras satisfatórias, uma percentagem de 11,1% de superfícies sujas e 2,8% de superfícies com limpeza duvidosa. Nestes dois últimos casos a queijaria deve adoptar medidas correctivas que melhorem a higienização e limpeza, sendo aconselhável repetir as análises após a adopção destas medidas.



**Figura 4: Percentagem de amostras superficiais com resultados satisfatórios ou insatisfatórios, considerando os resultados de *Enterobacteriaceae* na queijaria A.**

Na análise efectuada às superfícies na queijaria A ,conclui-se que 88,9% dos resultados obtidos são satisfatórios e 11,1% dos resultados são insatisfatórios. Neste último caso, deverão ser tomadas medidas correctivas de higienização e limpeza.



**Figura 5: Percentagem de amostras superficiais consideradas limpas, sujas ou com limpeza duvidosa, tendo em conta o número de microrganismos totais a 30°C, na queijaria B.**

Na análise efectuada a este parâmetro conclui-se que 65% das superfícies é considerada limpa, 15% com limpeza duvidosa e 20% superfície suja. Poderão dever-se a práticas de limpeza e desinfectação incorrectas, ao nível dos equipamentos, utensílios e instalação.

**Tabela 14: Resultados relativos às análises efectuadas a superfícies na queijaria B**

<b>Queijaria</b>	<b>Data de colheita da amostra</b>	<b>Ensaio/Colheita</b>	<b><i>Listeria monocytogenes</i> (pesquisa)</b>
<b>B</b>	12-05-2009	superfície nº1	Ausência
	12-05-2009	superfície nº2	Ausência
	12-05-2009	superfície nº3	Ausência
	12-05-2009	superfície nº4	Ausência
	12-05-2009	superfície nº5	Ausência
	12-05-2009	superfície nº6	Ausência
	12-05-2009	superfície nº7	Ausência
	12-05-2009	superfície nº8	Ausência
	12-05-2009	superfície nº9	Ausência
	12-05-2009	superfície nº10	Ausência
	12-05-2009	superfície nº11	Ausência
	12-05-2009	superfície nº12	Ausência
	12-05-2009	superfície nº13	Ausência
	12-05-2009	superfície nº14	Ausência
	12-05-2009	superfície nº15	Ausência
	12-05-2009	superfície nº16	Ausência
	12-05-2009	superfície nº17	Ausência
	12-05-2009	superfície nº18	Ausência
	12-05-2009	superfície nº19	Ausência
	12-05-2009	superfície nº20	Ausência

Na Queijaria B, os resultados obtidos foram satisfatórios, não se verificando presença de *Listeria monocytogenes*. Estes resultados levam-nos a pensar que os planos de higienização deverão estar a ser cumpridos e que os detergentes deverão ser os adequados.

Como *Listeria monocytogenes* é um microrganismo patogénico, perante estes resultados consideramos que as superfícies analisadas não constituem um factor de contaminação dos produtos laborados por *Listeria monocytogenes*.

## 5 – CONCLUSÃO

Após a conclusão deste estágio considero que todos os objectivos propostos foram atingidos.

Foi importante a sua realização, visto conseguir aplicar a teoria à prática e adquirir o máximo de conhecimentos sobre a rotina num Laboratório de Microbiologia Alimentar.

Em relação aos resultados obtidos, estes foram bastante positivos em ambas as queijarias.

A nível dos leites e queijos analisados, a maioria dos valores obtidos estavam dentro dos limites segundo a legislação adoptada pelo laboratório em relação a todos os microrganismos analisados, com excepção do leite de ovelha do T1 e T2 no dia de colheita 02-06-2009, que se obteve o valor de  $1,0 \times 10^7$ , superior aos valores limites. Este valor pode significar que houve alguma contaminação na ordenha ou no momento de recolha da amostra.

Os resultados das análises efectuadas às mãos dos manipuladores, em ambas as queijarias, foram todos negativos, o que nos leva a pensar que os manipuladores respeitam a forma correcta de lavagem e higienização das suas mãos. Este parâmetro é muito importante porque o contacto manual é uma das fontes de maior significância na problemática da contaminação de alimentos por microrganismos.

A nível dos resultados obtidos das análises a superfícies, na queijaria B obtiveram-se resultados negativos para a presença de *Listeria monocytogenes* e em relação aos microrganismos totais a 30°C esta queijaria teve uma maior percentagem de amostras satisfatórias. Na queijaria A, os resultados foram mais baixos do que na queijaria B para os microrganismos totais a 30°C, podendo significar que na queijaria B são adoptadas de uma forma mais correcta as práticas de uma boa higienização e limpeza do que na queijaria A.

No que respeita aos resultados de *Enterobacteriaceae*, apresentaram apenas 11,1% de resultados insatisfatórios. Dependendo do tipo de superfícies e do estado em que as mesmas se encontram, por vezes a lavagem e a desinfeção tornam-se difíceis sendo assim menos eficiente a remoção dos microrganismos, o que poderá justificar esta pequena percentagem de resultados insatisfatórios.

## 6 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Anónimo (s.d). Boas Práticas na Restauração Pública, Disponível em: <http://www.maramesa.wiremaze.com>. Acedido a 1 de Setembro de 2009.
- Anónimo (2007). Portal de Saúde Pública. Disponível em: <http://www.saude publica.web.pt>. Acedido a 7 de Setembro de 2009.
- Barbosa, M e Sá, F.V.de. (1990). O leite e os seus produtos. 5ªEdição, clássica editora. Lisboa
- Brito, P.V.A.M. e Brito, F.R.J. (s.d). Qualidade do leite. Capítulo 3. Págs. 61-72, Disponível em : [http://www.fernandomadalena.com/site\\_arquivos/903.pdf](http://www.fernandomadalena.com/site_arquivos/903.pdf). Acedido a 1 de Setembro de 2009.
- Canada, J, Ferro, P.S, Alvarenga, B.N. (2008). Qualidade Alimentar : Boas práticas de Higiene na Produção e Transformação do leite. Ano III. Nº4. Disponível em: <http://www.infoqualidade.net/sequali4indice.html>. Acedido em 27 de Julho de 2009
- Decreto-lei nº. 111/2006. Legislação relativa à higiene dos géneros alimentícios e às regras aplicáveis à produção e à comercialização de determinados produtos de origem animal destinados ao consumo humano.
- Directiva 92/46/CEE do Conselho. (1992). Adopção das normas sanitárias relativas à produção de leite cru, de leite tratado termicamente e de produtos à base de leite e à sua colocação no mercado. Conselho das comunidades europeias.
- Duarte, M.G. (1992). Incidência da *Listeria monocytogenes* e avaliação da qualidade higieno-sanitária do Queijo Fresco Português. Dissertação de Mestrado em Saúde Pública Veterinária. Faculdade de Medicina Veterinária. Universidade Técnica de Lisboa.
- Eck.A. (s.d). O queijo. 1º Volume. Publicações Europa-América, LDA.

- EN ISO 11290- 1:(1996). Microbiology of food and animal feeding stuffs. Horizontal method for the detection and enumeration of *Listeria monocytogenes*. Part 1: Detection method. European Committee for Standardization.
- EN ISO 6579:(2002). Microbiology of food and animal feeding stuff. Horizontal method for the detection of *Salmonella* spp. European Committee for Standardization.
- Filipe, S., Pintado C.S. (2002). Ocorrência de *Listeria monocytogenes* numa unidade produtora de queijo de ovelha. Conferência Internacional Food Protection, Monte da Caparica.
- Guerra, M.M. e F.A.Bernardo. (1999a). Ocorrência natural de *Listeria* spp em queijos alentejanos. Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias. XCIV(531):142-147.
- Guerra, M.M. e F.A.Bernardo. (1999b). Relevância Sanitária de *Listeria monocytogenes* nos produtos lácticos. Revista Portuguesa de Ciência Veterinárias. Vol.XCIV, Nº530.
- Guerra, M.M. e F.A.Bernardo. (2000). Ocorrência de *Listeria* spp. em leite e laticínios tradicionais portugueses. Revista Portuguesa de Zootecnia. Ano VII, Nº2.
- Guerra, M. M. M. e F. M. A. Bernardo. (2001). Caracterização de efeitos inibidores de *Listeria monocytogenes* Scott A, produzidos pela microflora de maturação de queijos do Alentejo. Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias. 96 (538) 65-69.
- ISO 4833:(2003). Microbiology of food and animal feeding stuffs -- Horizontal method for the enumeration of microorganisms -- Part 2: Colony count at 30 degrees C by the surface plating technique. International Organization for Standardization.-
- ISO 6888-1:(1999). Microbiology of food and animal feeding stuffs- Horizontal method for the enumeration of coagulase – positive staphylococci (*Staphylococcus aureus* and other specie) – Part 1: Technique using Baird- Parker agar medium. International Organization for Standardization.

- ISO 18593:(2004). Microbiology of food and animal feeding stuffs – Horizontal method for sampling techniques from surfaces using contact plates and swabs. International Organization for Standardization.
- Lacasse, D. (1995). Introdução à Microbiologia Alimentar. Editora Ciências e Técnica. Instituto Piaget, Lisboa.
- Matias P. e Pintado C.S. (1999). Queijo de Nisa – Evolução da flora microbiana ao longo da maturação. 2º Congresso Nacional de Microbiologia MICRO'99, Luso.
- Medeiros, L. (2008). Qualidade Alimentar : Classificação do leite na Produção. Ano III. Nº4. Disponível em: <http://www.infoqualidade.net/sequali4indice.html>. Acedido em 27 de Julho de 2009.
- Mena, C., Almeida, G., Carneiro, L., Teixeira, P., Hogg, T., Gibbs, P. A.(2004). Incidence of *Listeria monocytogenes* in different food products commercialized in Portugal. Food Microbiology 21, 213-216.
- Pereira D., Pintado C.S. (2000). Incidência de *Listeria monocytogenes* e outras *Listeria* spp. em leite cru de ovelha. Conferência Internacional Food Safety. Porto.
- Pintado, C.M.B.S. (1996). Isolamento de *Listeria monocytogenes* no queijo de Castelo Branco usando o método IDF e o *Listeria*-Tek ELISA. Dissertação de Mestrado em Ciências e Tecnologia de Alimentos. Instituto Superior de Agronomia. Universidade Técnica de Lisboa.
- Pintado, C.M.B.S., Oliveira, A., Pampulha, M.E., Ferreira, M.A,S.S, (2005). Prevalence and characterization of *Listeria monocytogenes* isolated from soft cheeses. Food Microbiology, 22, 79-85.
- Portaria nº.56/96. Normas sanitárias aplicáveis a produção e colocação no Mercado de leite cru, de leite de consumo tratado termicamente, de leite destinado à transformação e de produtos à base de leite, destinados ao consumo humano.

- Regulamento (CE) nº. 852. (2004). Relativo à higiene dos géneros alimentícios. Parlamento Europeu e do Conselho de 29 de Abril de 2004.
- Regulamento (CE) nº. 853.(2004). Relativo a regras específicas de higiene aplicáveis aos géneros alimentícios de origem animal. Parlamento Europeu e do Conselho de 29 de Abril de 2004.
- Regulamento (CE) nº.1441. (2007). Relativo a critérios microbiológicos aplicáveis a géneros alimentícios. Comissão das Comunidades Europeias.
- Rocha, B. (2007). Manipuladores de Alimentos: Formação básica em segurança alimentar. 17 Abril de 2007. Covilhã.
- Sanchez, P.A.M. (2004). Influência da matéria-prima no fabrico de queijo de cabra. Relatório do Trabalho de Fim de Curso de Engenharia Alimentar. Instituto Superior de Agronomia. Lisboa.
- Severo,L. (2006). Os efeitos do processamento na degradação das tetraciclinas em leite e derivados. Disponível em: [http://www.unoescxe.edu.br/web\\_reitoria/noticias\\_unoesc/desc\\_noticias.php?cod\\_noticia=904](http://www.unoescxe.edu.br/web_reitoria/noticias_unoesc/desc_noticias.php?cod_noticia=904). Acedido em 22 de Setembro de 2009.
- Sousa. J. C. F. de. (2000). *Enterobacteriaceae*. In: Ferreira, W. F. C e Sousa, J. C.F de (coord.). Microbiologia. Vol. 2. Lidel – Ed. Técnicas Lda, Portugal.
- Zaffari. B.C. (2005). Detecção de *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes* e *Brucella* sp. em queijos produzidos artesanalmente na região litorânea do Rio Grande do Sul. Dissertação de Mestrado. Porto Alegre, Brasil.

## **Agradecimentos**

Ao Prof. Dr. Pedro Rocha pela oportunidade que me deu de estagiar no Laboratório Brito Rocha Lda., pela incentivação e apoiou ao longo do estágio

À Dr<sup>a</sup> Celina, à Mariana e a toda a equipa que trabalha no laboratório pelos conhecimentos que me transmitiram e pela maneira afável como fui tratada.

À Dr<sup>a</sup> Cristina Pintado, por me ter tido a amabilidade de ser a minha orientadora na Escola Superior Agrária de Castelo Branco, bem como toda a ajuda, disponibilidade e apoio que me deu sempre que precisei.

Aos meus pais por toda a ajuda que me deram ao longo deste tempo, por toda a paciência que tiveram nos momentos menos bons, sem vocês nada disto era possível.

A ti Sofi, por toda a ajuda ao longo deste tempo, por toda a cativação, obrigada miga por tudo.

À Lila e à Lili, obrigada pela vossa amizade, foi muito bom ter vos conhecido e passar por tanta coisa juntas, nunca vou esquecer.

A todos os que me ajudaram na realização deste trabalho, bem como ao longo deste tempo na ESACB, um muito obrigado.