

SEGURANÇA E QUALIDADE DE QUEIJOS

MICROBIOTA PATOGENICA
E DETERIORATIVA ASSOCIADA

JOANA ALVES
ALEXANDRA ESTEVES
JOSÉ ANTÓNIO SILVA
CRISTINA SARAIVA

AUTORES

Joana Alves
Alexandra Esteves
José António Silva
Cristina Saraiva

TÍTULO

Segurança e Qualidade de Queijos

Microbiota patogénica e deteriorativa associada

EDIÇÃO

Quântica Editora – Conteúdos Especializados, Lda.
E-mail: geral@quanticaeditora.pt · www.quanticaeditora.pt
Praça da Corujeira n.º 38 · 4300-144 PORTO

CHANCELA

Agrobook - Conteúdos Técnicos e Científicos

DISTRIBUIÇÃO

Booki – Conteúdos Especializados
Tel. 220 104 872 · Fax 220 104 871 · E-mail: info@booki.pt · www.booki.pt

APOIO

CECAV – Centro de Ciência Animal e Veterinária, suportado por verbas do projeto UIDB/CVT/00772/2020 financiado pela Fundação Portuguesa para a Ciência e Tecnologia (FCT).

REVISÃO

Quântica Editora – Conteúdos Especializados, Lda.

DESIGN

Luciano Carvalho · Delineatura – Design de Comunicação · www.delineatura.pt

IMPRESSÃO

abril, 2020

DEPÓSITO LEGAL

466683/20



A **cópia ilegal** viola os direitos dos autores.
Os prejudicados somos todos nós.

Copyright © 2020 | Todos os direitos reservados a Quântica Editora – Conteúdos Especializados, Lda.

A reprodução desta obra, no todo ou em parte, por fotocópia ou qualquer outro meio, seja eletrónico, mecânico ou outros, sem prévia autorização escrita do Editor e dos Autores, é ilícita e passível de procedimento judicial contra o infrator.

Este livro encontra-se em conformidade com o novo Acordo Ortográfico de 1990, respeitando as suas indicações genéricas e assumindo algumas opções específicas.

CDU
637 Produtos de animais domésticos e caça

ISBN
Papel: 9789899017153
E-book: 9789899017160

Catálogo da publicação
Família: Engenharia Alimentar
Subfamília: Produção de Novos Produtos

SEGURANÇA E QUALIDADE DE QUEIJOS

**MICROBIOTA PATOGENICA
E DETERIORATIVA ASSOCIADA**

**JOANA ALVES
ALEXANDRA ESTEVES
JOSÉ ANTÓNIO SILVA
CRISTINA SARAIVA**

Agradecimentos	vii
Lista de Abreviaturas.....	ix
INTRODUÇÃO	11
Enquadramento temático.....	11
Toxinfecções alimentares.....	12
Surto e casos de toxinfecções alimentares associadas ao consumo de queijos...	13
CAPÍTULO 1. O Queijo como alimento	17
1.1. Enquadramento histórico e classificação.....	17
1.2. Constituição do queijo.....	20
1.3. Produção de queijo.....	20
1.3.1. Aquecimento do leite	22
1.3.2. Adição de coalho e outros ingredientes.....	22
1.3.3. Coagulação.....	23
1.3.4. Dessoramento e prensagem	24
1.3.5. Salga	24
1.3.6. Maturação	25
1.4. Conservação do queijo	25
CAPÍTULO 2. Fatores que afetam a segurança e qualidade do queijo.....	27
2.1. Características físico-químicas.....	27
2.2. Contaminação microbiana.....	28
CAPÍTULO 3. Microbiota associada a queijos.....	31
3.1. Microbiota deteriorativa.....	31
3.1.1. Mesófilos.....	31
3.1.2. Bactérias do ácido láctico (BAL).....	31

3.1.3. Enterobacteriaceae.....	32
3.1.4. Bolores e leveduras.....	33
3.15. Clostrídios produtores de ácido butírico.....	34
3.2. Microbiota patogénica.....	34
3.2.1. <i>Escherichia coli</i>	34
3.2.2. <i>Staphylococcus aureus</i>	35
3.2.3. <i>Listeria monocytogenes</i>	37
CAPÍTULO 4. A contaminação por <i>Listeria monocytogenes</i> associada a queijos	39
4.1. Listeriose no Homem.....	40
4.2. Prevenção e controlo de <i>L. monocytogenes</i> em alimentos.....	40
CAPÍTULO 5. Bacteriocinas - interesse e aplicação	43
5.1. Definição e tipo de bacteriocinas.....	43
5.2. Biossíntese e mecanismo de ação.....	45
5.3. Bactérias produtoras de bacteriocinas.....	46
5.4. O uso de bacteriocinas no fabrico de queijos.....	48
5.5. Limitações no uso de bacteriocinas e propostas de melhoria.....	50
CONCLUSÃO	53
Bibliografia	iv

Enquadramento temático

A indústria de produção de queijo constitui um grande setor em todo o mundo, englobando queijos produzidos em diferentes regiões caracterizados por uma grande diversidade (Fox *et al.*, 2004). Em Portugal, os dados do INE (Instituto Nacional de Estatística) de 2013 mostram que a produção total de queijos decresceu 3,3%, exceto a produção do queijo de mistura, a qual aumentou 7,1% (INE, 2014). Entretanto, em 2015 a tendência de decréscimo da produção total de queijos manteve-se apesar de menor (1,7%) com uma subida, também inferior, da produção do queijo de mistura (6,4%). Refira-se, contudo, que a produção de queijo de ovelha revelou uma tendência crescente de 0,6% (INE, 2016).

A literatura científica tem relatado surtos de toxinfecções alimentares graves associados ao consumo de vários tipos de queijo (Kousta *et al.*, 2010). Os agentes de doença mais referidos são, entre outros, *Salmonella spp.*, *Listeria monocytogenes* e *Staphylococcus aureus*. *Listeria monocytogenes* assume um papel de destaque, sendo um dos microrganismos mais frequentemente associado a doenças de origem alimentar por consumo de queijos, especialmente em queijos com pouco de tempo de cura (Buncic, 2006).

As regras de higiene comuns aos géneros alimentícios estão estabelecidas no Regulamento Europeu 852/2004 que se aplica diretamente para os Estados-Membros (RE 852, 2004) e as regras específicas de higiene aplicáveis aos géneros alimentícios de origem animal pelo Regulamento Europeu 853/2004 (RE 853, 2004). A aplicação de critérios microbiológicos é usada para avaliar a segurança do alimento, verificar a aplicação de boas práticas de higiene e de fabrico e manter a qualidade de alimentos perecíveis durante a sua vida útil comercial. A aplicação destes critérios pode ser útil para assegurar a confiança do consumidor em relação à segurança alimentar desse produto (Smoot e Pierson, 1997).

exposição a agentes patogênicos de toxinfecções alimentares depende de fatores relacionados com o hospedeiro, incluindo o seu sistema imunitário, estado nutricional, idade, assim como de outros fatores específicos do alimento e do microrganismo (Jouve *et al.*, 1999). Nas toxinfecções alimentares será necessário que o microrganismo patogênico se encontre em quantidade suficiente para causar uma infecção e/ou para produzir toxinas em quantidade suficiente. Assim, o alimento não só permite a multiplicação dos microrganismos patogênicos como serve de substrato à produção de toxinas em quantidade suficiente, de modo a ultrapassar o limiar de suscetibilidade do consumidor (Forsythe, 2002).

Surtos e casos de toxinfecções alimentares associadas ao consumo de queijos

A literatura científica tem relatado surtos e casos de toxinfecções alimentares graves associados ao consumo de vários tipos de queijos (Kousta *et al.*, 2010). Na literatura está bem documentado que os surtos de origem alimentar causados pelo consumo de diferentes tipos de queijo estão mais frequentemente relacionados com a presença de *L. monocytogenes*, *S. aureus*, *Salmonella* spp. ou *E. coli* O157:H7 (Araujo *et al.*, 2002; Foschino *et al.*, 2002; Haeghebaert *et al.*, 2003; Conedera *et al.*, 2004). A presença dessas bactérias patogênicas em queijos de leite cru ou queijos que sofrem contaminação após a pasteurização representam uma ameaça eminente para a saúde humana (Kousta *et al.*, 2010). Durante muitos anos, o consumo de queijos de leite cru tinha sido apenas esporadicamente associado a doenças de origem alimentar. No entanto, nas últimas duas décadas, a segurança no consumo de queijo de leite cru tem sido questionada devido à ocorrência de vários surtos de doenças tanto na Europa como nos EUA (Brooks *et al.*, 2012).

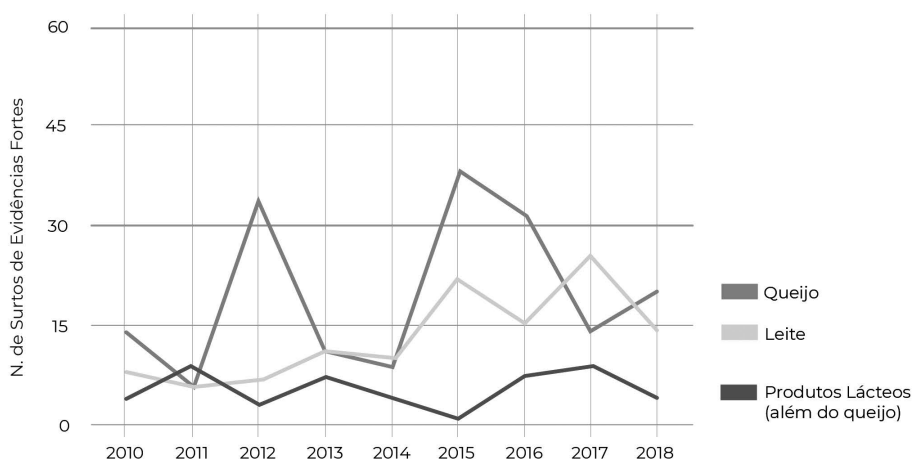


Figura 1. Surtos de evidência forte associados ao consumo de produtos lácteos.

Fonte: EFSA (2019).

Segundo relatório da EFSA (*European Food Safety Authority*) de 2019 (EFSA, 2019), o queijo tem sido o principal produto implicado em surtos associado ao consumo de produtos láteos, como se pode observar através da Figura 1. No ano de 2015, foram notificados 33 surtos de evidência forte, envolvendo 380 pessoas, através do consumo de queijo nos Estados-membros que reportam para a União Europeia. A partir de 2015 ocorreu um decréscimo, tendo sido reportados, em 2018, 20 surtos, envolvendo 90 pessoas (Figura 1) (adaptado de EFSA, 2019), com os queijos a estarem associados em 2,8% do total de surtos de origem alimentar, incluindo a água. O agente mais prevalente apontado foi *Salmonella*, não havendo nenhum registo de surto associado a *Listeria* em 2018 (Figura 2) (EFSA, 2019).

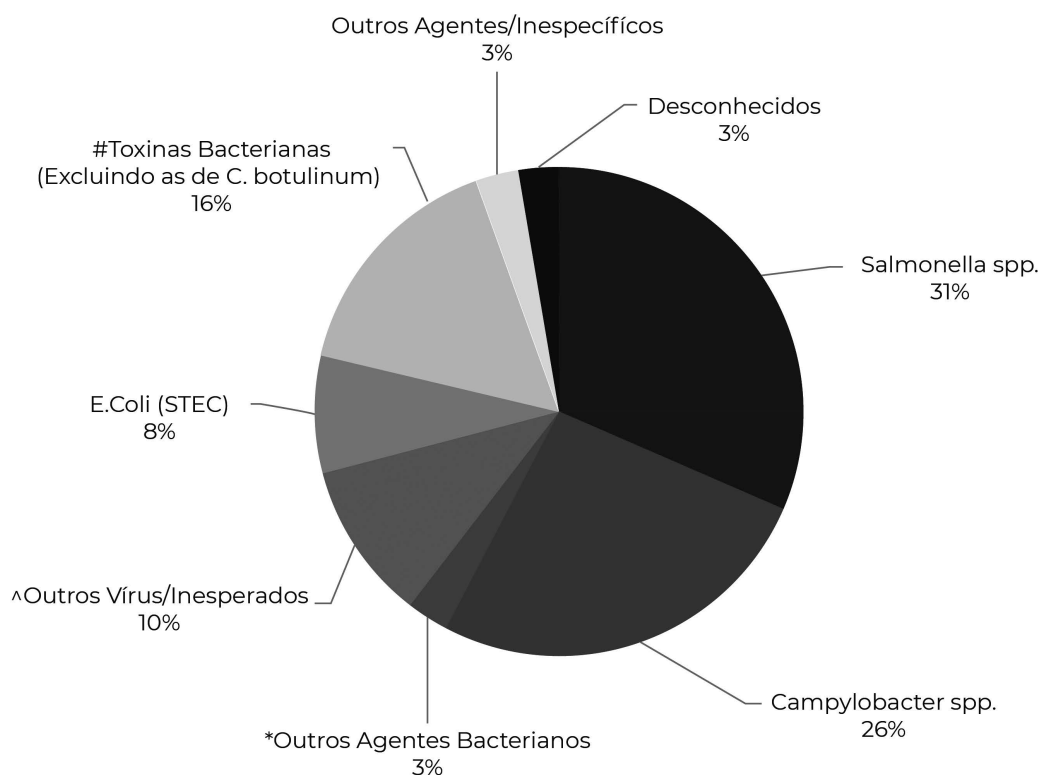


Figura 2. Frequência de agentes patogênicos e toxinas associadas a surtos de evidência forte em leite e laticínios ocorridos em 2018, valores aproximados (adaptado de EFSA, 2019).

Legenda:

*Outros agentes bacterianos incluem *Aeromonas hydrophila*, *Escherichia coli*, *Escherichia coli* enteroinvasiva (EIEC), *Escherichia coli* enterotoxigênica (ETEC), *Enterococcus*, *Leptospira spp.*, *Shigella spp.*, *Yersinia enterocolitica* e outras bactérias não especificadas. #Toxinas bacterianas (excluindo as de *Clostridium botulinum*) incluem toxinas produzidas por *Bacillus*, *Clostridium* que não *Clostridium botulinum* e *Staphylococcus* e outras toxinas bacterianas não especificadas.

^Outros vírus incluem adenovírus, flavivírus, hepatite E, rotavírus e outros vírus não especificados.

CAPÍTULO 1.

O QUEIJO COMO ALIMENTO

1.1. Enquadramento histórico e classificação

O queijo é um dos alimentos preparados mais antigos que a história da humanidade regista. A arte do fabrico de queijos teve o seu início num passado muito remoto, milhares de anos antes do nascimento de Cristo. Os egípcios foram dos primeiros povos que cuidaram do gado e tiveram no leite e no queijo uma fonte importante da sua alimentação. Na Europa, os gregos foram os primeiros a adotar o queijo como alimento, feito exclusivamente com leite de cabra e de ovelha. Entretanto, os romanos, na expansão do seu Império, foram os responsáveis pela maior divulgação mundial dos queijos (Rehm e Reed, 1983; Blom e Weréén, 2002; Perry, 2004). A produção em massa de queijo teve início no século XIX, com a abertura da primeira fábrica de queijo nos EUA, em 1851, no estado de Nova York. No entanto, a indústria de queijos só se instalou na Europa no início do século XX, com a abertura da primeira grande queijaria em França, sendo este o país que mais se dedicou ao fabrico e ao consumo de queijo, permanecendo como um dos principais países produtores do mundo, ao lado de Itália, Dinamarca, Alemanha, Suíça e Inglaterra (Perry, 2004).

É particularmente interessante referir que uma grande variedade de queijos surgiu associada a um acidente determinado por circunstância local (composição do leite, microbiota endógena, espécie e raça do animal) ou devido a um único evento durante a tentativa de produção ou stock do queijo (crescimento de bolores ou outros microrganismos) (de Paula *et al.*, 2009).

Existem pelo menos 1000 variedades de queijos, sendo que as principais variedades são representadas pelos queijos Holandeses, Suiços, Cheddar e Parmesão, representando mais de 80% da produção mundial (de Paula *et al.*, 2009).

último corresponde à porção aquosa que se separa da massa durante a produção de queijo e que retém cerca de 55% dos nutrientes do leite. Aproximadamente 85 a 90% do volume de leite utilizado no fabrico de queijos resulta em soro, muitas vezes aproveitado para a produção de requeijão. O rendimento de produção e a composição centesimal do queijo são determinados pelas propriedades do leite, especialmente pela composição e pelas etapas do processo de fabrico (Buncic, 2006). Aproximadamente 30% da produção mundial de leite destina-se ao fabrico de queijos (de Paula *et al.*, 2009).

De uma forma geral, para o fabrico de queijo seguem-se as várias etapas representadas no esquema:

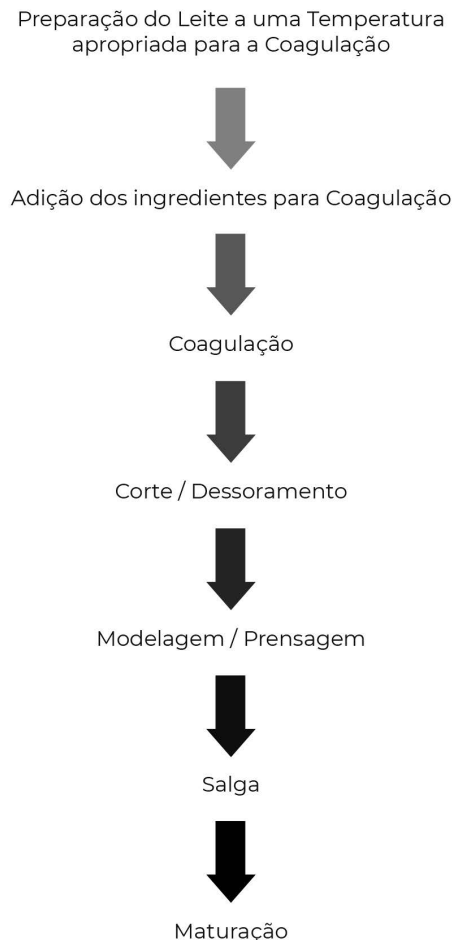


Figura 3. Processo genérico de fabrico de queijo (Adaptado de Alves, 2018).

CAPÍTULO 2.

FATORES QUE AFETAM A SEGURANÇA E QUALIDADE DO QUEIJO

2.1. Características físico-químicas

O **pH** é um dos parâmetros mais críticos no que diz respeito à segurança alimentar e ao controle de qualidade do processo de fabricação do queijo. A sua determinação é importante para caracterizar os queijos devido à sua influência na textura, atividade microbiana e maturação, pois existem reações químicas catalisadas por enzimas derivadas de coalho e microbiota que dependem do pH (Watkinson *et al.*, 2001; Sousa *et al.*, 2014).

O leite tem um pH próximo de 6,8, o que significa que em termos de pH é um meio adequado à multiplicação da maioria das bactérias. A redução do pH do queijo, para valores entre 4,5 e 5,5 contribui para a prevenção do desenvolvimento de bactérias patogênicas e da maioria dos microrganismos envolvidos na deterioração do queijo (Cabezas *et al.*, 2007).

No controle do pH ao longo da maturação, observa-se uma fase inicial de diminuição do pH, correspondente à conversão da lactose em ácido lático pela ação das bactérias do ácido lático (quer sejam nativas quer sejam adicionadas) que apresenta uma elevada importância nas características da coalhada e na eliminação do soro; e uma fase final da cura, em que se verifica um aumento de pH, atribuído à utilização do ácido lático e formação de compostos neutros ou alcalinos. A diminuição de pH observado na fase inicial da cura é mais evidente em queijos obtidos a partir de leite cru do que em queijos obtidos a partir de leite pasteurizado, em que são utilizadas culturas de arranque (Watkinson *et al.*, 2001).

A **atividade da água** (a_w) é um parâmetro importante para o desenvolvimento microbiano. Os queijos com maior a_w apresentam uma maior tendência para se deteriorarem ou para

CAPÍTULO 3.

MICROBIOTA ASSOCIADA A QUEIJOS

3.1. Microbiota deteriorativa

3.1.1. Mesófilos

Os microrganismos mesófilos desenvolvem-se a uma temperatura média de 30°C (Siqueira, 1995). A determinação dos microrganismos aeróbios totais a 30°C baseia-se no pressuposto que cada célula, na presença de nutrientes adequados, se replica e forma uma colónia visível. Embora não seja uma medida da população bacteriana total, nem permita diferenciar por tipo de microrganismo, é uma determinação genérica para microrganismos como bactérias, bolores e leveduras, que se multiplicam a temperaturas intermédias e que se desenvolvem de forma aeróbia (Downes e Ito, 2001).

O teor de microrganismos aeróbios mesófilos (contagem em placa) encontrado num alimento tem sido um dos indicadores microbiológicos de qualidade mais utilizados, a fim de verificar a aplicação de boas práticas de fabrico e obter informações sobre matérias-primas, condições de processamento, de armazenamento e de manipulação dos alimentos. Esta determinação permite também determinar a sua vida útil provável (Siqueira, 1995; Downes e Ito, 2001).

3.1.2. Bactérias do Ácido Lático (BAL)

As BAL são bactérias Gram positivo, anaeróbias facultativas e não esporuladas, com formas tanto de bacilos como cocos. O seu pH ótimo varia entre 6,0 e 6,5 (apesar de algumas espécies

CAPÍTULO 4.

A CONTAMINAÇÃO POR *LISTERIA MONOCYTOGENES* ASSOCIADA A QUEIJOS

Após alguns surtos associados com o consumo de leite e produtos lácteos, *L. monocytogenes* tornou-se um microrganismo alvo de grande preocupação para a indústria de laticínios, devido à alta taxa de mortalidade associada (Arqués *et al.*, 2005). Cerca de metade do total de surtos de listeriose na Europa estão associados ao consumo de produtos lácteos contaminados com *L. monocytogenes* (Melo *et al.*, 2015).

A contaminação direta de leite cru por *L. monocytogenes* ocorre devido a animais com listeriose. Animais assintomáticos podem também veicular o microrganismo patogénico de forma intermitente no leite (Arqués *et al.*, 2005). O leite cru pode também ser contaminado com *L. monocytogenes* a partir de equipamentos durante a ordenha, durante o armazenamento em tanques de refrigeração ou durante o transporte para a unidade de processamento de queijo, onde as medidas de controlo de higiene podem não ser as mais adequadas. Esta bactéria pode sobreviver e multiplicar-se em ambientes de processamento pós-pasteurização devido à sua capacidade em aderir a superfícies alimentares e não-alimentares, no equipamento e em instalações de armazenamento. A formação de biofilmes potencia a propagação deste agente patogénico para o produto final, onde pode permanecer viável e multiplicar-se durante a sua vida de prateleira (Melo *et al.*, 2015).

Uma elevada quantidade de amostras positivas a *L. monocytogenes* foi associada ao uso de um *layout* do processo de fabrico do queijo mal elaborado e higiene pessoal deficiente (Melo *et al.*, 2015).

Os queijos são produtos prontos para consumo, que não têm qualquer etapa no processo de fabrico que envolva o tratamento térmico imediatamente antes do consumo e são

CAPÍTULO 5.

BACTERIOCINAS

- INTERESSE E APLICAÇÃO

5.1. Definição e tipo de bacteriocinas

As bacteriocinas são peptídeos antimicrobianos sintetizados ao nível do ribossoma de bactérias, libertados para o meio extracelular, que exibem antagonismo principalmente contra bactérias Gram positivo de espécies relacionadas. Algumas bacteriocinas são também ativas contra certas bactérias Gram negativo, tais como *Escherichia coli* e *Salmonella Typhimurium* (Ghraiiri *et al.*, 2008; Todorov *et al.*, 2010; Sabo *et al.*, 2014; Favaro *et al.*, 2015; Aspri *et al.*, 2017).

Um grande número de bacteriocinas são produzidos por BAL, destacando-se o género *Lactobacillus*, o qual engloba mais de 150 espécies (Moreno *et al.*, 2003; Sabo *et al.*, 2014). Estes compostos possuem propriedades antibióticas mas diferem da maioria dos antibióticos terapêuticos por serem de origem proteica e por apresentarem, geralmente, especificidade de ação contra as estirpes da mesma espécie ou de espécies estreitamente relacionadas (Chen e Hoover, 2003). As estirpes produtoras de bacteriocinas têm um mecanismo de imunidade específica para protegê-las contra as suas próprias bacteriocinas (Goh e Philip, 2015). As bacteriocinas produzidas por BAL oferecem potenciais aplicações biotecnológicas visto serem estáveis em valores baixos de pH, de fácil de produção e livres de efeitos adversos (Todorov *et al.*, 2010).

As bacteriocinas são geralmente divididas em 3 grupos bem definidos, com base na sua estrutura e função:

CONCLUSÃO

A avaliação da microbiota deteriorativa e patogénica dos leites e dos queijos ao longo do seu processo de maturação tem importância para implementação de medidas preventivas e/ou corretivas no fabrico de queijos. Entre outros aspetos deve analisar-se a importância da necessidade da aplicação da pasteurização no leite destinado ao fabrico de queijo dada a contaminação que por vezes se deteta em queijos produzidos com leite cru. Neste sentido, realçamos a necessidade de uma adoção e implementação contínua de programas de segurança alimentar baseados nos princípios HACCP ao longo da cadeia de produção, a fim de melhorar a higiene na exploração, a redução na carga microbiana no leite cru e para aumentar a segurança do produto final. Entre outras medidas é imperativo implementar práticas de produção primária que garantam a saúde animal, o controlo de mastites, boas práticas de ordenha, um programa de certificação para contrariar a distribuição de animais infetados, a aplicação de um tratamento térmico eficaz do leite (como a referida pasteurização), o controlo para evitar a contaminação pós-pasteurização, assim como boas práticas de higiene das instalações e dos manipuladores.

As bacteriocinas, produzidas *in situ* ou usadas como aditivos alimentares, podem ser alternativas tecnológicas interessantes para controlar microrganismos patogénicos e, conseqüentemente, melhorar a segurança dos produtos alimentares. Estes metabolitos naturais podem substituir o uso de aditivos químicos como ácido sórbico, dióxido de enxofre, nitrito, nitrato, entre outros. Ainda neste contexto, a estabilidade observada das frações liofilizadas de bacteriocinas em pó seco poderia ser mais vantajosa, no sentido de poder ser transportado a baixo custo e de fácil aplicação, possibilitando ao alimento uma vida de prateleira mais longa.

SEGURANÇA E QUALIDADE DE QUEIJOS

MICROBIOTA PATOGENICA E DETERIORATIVA ASSOCIADA

JOANA ALVES · ALEXANDRA ESTEVES · JOSÉ ANTÓNIO SILVA · CRISTINA SARAIVA

Sobre a obra

A literatura científica tem relatado surtos e casos de toxinfecções alimentares graves associados ao consumo de vários tipos de queijos, contaminados com *L. monocytogenes*, *S. aureus*, *Salmonella* spp. ou *E. coli* O157:H7.

Neste sentido, é essencial preservar a qualidade da matéria-prima através da inibição do desenvolvimento de microrganismos patogénicos e deteriorativos. Em queijos, uma alternativa tecnológica à preservação convencional (aditivos químicos, excesso de sal, entre outros) poderá passar pelo uso de bacteriocinas purificadas ou semi-purificadas ou bactérias do ácido láctico (BAL) produtoras de bacteriocinas, como agentes naturais de conservação.

As bacteriocinas usadas como aditivos alimentares poderão vir a considerar-se como alternativas tecnológicas interessantes ao uso de aditivos químicos para controlar microrganismos patogénicos e, conseqüentemente, melhorar a segurança dos produtos alimentares.

Sobre os autores

Joana Alves

Licenciada em Ciências da Nutrição pela Faculdade de Ciências da Nutrição e Alimentação da Universidade do Porto. Mestre em Segurança Alimentar pela Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro. Autora de comunicações científicas em congressos e de artigos científicos em revistas nacionais. Responsável pela gestão de unidade de restauração hospitalar certificada nas ISO 22000, 9001, 14001 e OHSAS 18001.

Alexandra Esteves

Licenciada em Medicina Veterinária pela Universidade de Lisboa e Doutora em Ciências Veterinárias pela Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro. Docente do ensino superior (UTAD) e membro do CECAV. Orientadora de dissertações de mestrado e teses de doutoramento na área da Segurança Alimentar. Autora de artigos e capítulos de livro e de comunicações científicas em congressos nesta área.

José António de Oliveira e Silva

Licenciado em Eng. Zootécnica, Mestre em Produção Animal e Doutor em Ciência Alimentar pela Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro (UTAD). Docente da UTAD e membro do CECAV. Atividade científica na área da tecnologia de produtos animais e segurança alimentar, com orientação de dissertações de mestrado e arguente de dissertações de mestrado e de doutoramento. Autor de artigos e de comunicações científicas em congressos.

Cristina Saraiva

Licenciada em Medicina Veterinária e Doutora em Ciências Veterinárias pela Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro. Docente do ensino superior (UTAD) e membro do CECAV. Atividade científica na área da qualidade e segurança alimentar, principalmente na determinação de vida útil de alimentos. Orientadora de dissertações de mestrado e teses de doutoramento na área da Segurança Alimentar. Autora de artigos, capítulos de livro e de comunicações científicas nesta área.

Apoios



CECAV
ANIMAL AND VETERINARY
RESEARCH CENTRE

FCT
Fundação
para a Ciência
e a Tecnologia



Também disponível em formato e-book



ISBN: 978-989-901-715-3



www.agrobook.pt