



## Caracterização da microbiota do queijo colonial artesanal produzido pela agricultura familiar do Sudoeste do Paraná

### Characterization of the microbiota of artisanal colonial cheese produced by family farming in Southwest Paraná

Sophia Tonial Meurer<sup>1</sup>, Joyce Barbara Baldissera<sup>2</sup>, Fabiane Picinin de Castro Cislaghi<sup>3</sup>, Andréa Cátia Leal Badaró<sup>4</sup>

#### RESUMO

O queijo colonial artesanal, comumente produzido na região Sudoeste do Paraná, é elaborado a partir de leite cru e se caracteriza por passar por simples processos de transformação e de curta maturação. O desafio dos produtores desse queijo é inseri-lo em mercados formais, atendendo a legislação, já que a maioria não atende ao período mínimo de maturação de 60 dias. O projeto teve por objetivo isolar amostras da microbiota de Bactérias lácticas (BAL) em amostras de queijo, auxiliar na definição das condições de maturação e orientar sobre as normas de produção segura deste tipo de alimento. As análises microbiológicas e de isolamento da microbiota endógena ocorreram ao durante os meses de janeiro a julho de 2023, nos quais as amostras de queijo maturaram em condições diferentes de armazenamento e temperatura, e as análises foram feitas ao longo das semanas de maturação. As cepas de BALs encontradas apresentaram relativa capacidade de resistência à maioria dos antimicrobianos testados, indicando possível aplicação tecnológica e funcionalidade probiótica. Portanto, os queijos podem apresentar uma qualidade microbiológica superior, mas ainda é necessário que o trabalho continue a fim de diminuir possíveis riscos de contaminação por patógenos ao longo da maturação.

**PALAVRAS-CHAVE:** leite cru; maturação; bactérias lácticas.

#### ABSTRACT

Artisanal colonial cheese, commonly produced in the Southwest region of Paraná, is made from raw milk and is characterized by undergoing simple transformation processes and short maturation. The challenge for producers of this cheese is to insert it into formal markets, complying with legislation, as the majority do not meet the minimum maturation period of 60 days. The project aimed to isolate samples of the lactic acid bacteria (LAB) microbiota in cheese samples, assist in defining maturation conditions and provide guidance on safe production standards for this type of food. The microbiological and isolation analyzes of the endogenous microbiota took place during the months of January to July 2023, in which the cheese samples matured under different storage and temperature conditions, and the analyzes were carried out over the weeks of maturation. The LAB strains found showed relative resistance to most of the antimicrobials tested, indicating possible technological application and probiotic functionality. Therefore, the cheeses may have superior microbiological quality, but work still needs to continue in order to reduce possible risks of contamination by pathogens throughout maturation.

**KEYWORDS:** raw milk; maturation; lactic acid bact.

<sup>1</sup> Voluntária PIVICT. Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Francisco Beltrão, Paraná, Brasil. E-mail: sophiatonialmeurer@gmail.com. ID Lattes: 7870807285770969.

<sup>2</sup> Bolsista PIBIC / PIBIT. Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Francisco Beltrão, Paraná, Brasil. E-mail: joycebarbarabaldissera2004@gmail.com. ID Lattes: 4636576866576005.

<sup>3</sup> Docente do Curso de Engenharia de Alimentos. Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Francisco Beltrão, Paraná, Brasil. E-mail: fabianecastro@utfpr.edu.br. ID Lattes: 7487600889349104.

<sup>4</sup> Orientadora. Docente do Curso de Engenharia de Alimentos. Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Francisco Beltrão, Paraná, Brasil. E-mail: andreabadaro@utfpr.edu.br. ID Lattes: 8224031106724853.



## INTRODUÇÃO

O estado do Paraná é o 2º maior produtor de leite do Brasil, ficando atrás apenas de Minas Gerais, produzindo 4,3 bilhões de litros de leite por ano. Apenas a mesorregião Sudoeste do estado é responsável por mais de 23% dessa produção, a qual vem, em sua grande maioria, de pequenos produtores. Mais de 50% do leite produzido é destinado a fabricação de algum tipo de queijo nessa região do Paraná, que tem 64 queijarias registradas (SILVA et al., 2015).

Dentre os diferentes tipos de queijos produzidos na região Sudoeste, o queijo colonial é um dos mais procurados e bem aceitos pela população consumidora, devido as raízes tradicionais associadas a esse produto. Essa aptidão queijeira é uma alternativa para os produtores de leite locais, que agregam valor ao seu leite, vendendo não somente a matéria prima, como também o produto pronto para consumo. Além disso, o queijo colonial é considerado um alimento artesanal, ou seja, segue métodos tradicionais de produção, sendo feito de maneira rudimentar, com poucas transformações em pequena escala, e comercializados informalmente (SILVA et al., 2015).

A comercialização de produtos artesanais coloca em evidência a discussão em relação a qualidade desses produtos, com ênfase aos que são produzidos e vendidos informalmente. O queijo colonial artesanal tem sua qualidade oriunda da matéria-prima da qual é fabricado tanto quanto das condições de manipulação, para atendimento de padrões físico-químicos e microbiológicos, nas quais é produzido. Ou seja, as características desse produto estão diretamente relacionadas com o leite cru utilizado e com o saber-fazer tradicional e cultural por trás desse processo (CRUZ, MENASCHE, 2014).

O desafio atual dos produtores e comerciantes de queijo colonial não é diferente para outros produtos artesanais. Em suma, significa inserir esse alimento em mercados formais, a fim de atender as exigências legais. Entretanto, torna-se necessário adaptar o modo de fazer sem que o produto perca as características que fazem desse queijo tão único, cultural e tradicional da região sudoeste do Paraná (CRUZ, MENASCHE, 2014).

O objetivo deste projeto foi detectar microrganismos indicadores de qualidade sanitária nos queijos coloniais artesanais produzidos no sudoeste do Paraná, e coletar amostras desses queijos para isolar a microbiota existente nestas amostras. Além disso, auxiliar na definição das melhores condições de maturação e processamento do produto, de acordo com o clima da região e os ambientes de produção das queijarias parceiras.

## MATERIAIS E MÉTODOS

Inicialmente foram contactados os produtores da região que produzem o queijo colonial artesanal, e destes, 3 aceitaram participar do projeto. Foram então estabelecidos 3 tipos de maturação para que se comparasse os diferentes resultados baseados nos parâmetros destas condições usuais de maturação realizada pelos produtores da região.

Foi então elaborado lotes únicos de queijos, sendo então divididos em 3 condições diferentes de maturação: em geladeira comum, em temperatura ambiente (realizado nas dependências do Laboratório de Tecnologia de Leite e Derivados da UTFPR-FB) e na condição normal utilizada pela queijaria participante, sendo em sala de alvenaria com uso de ar condicionado comum.

Semanalmente, 3 amostras de cada queijo eram levadas ao Laboratório de Leite e Derivados da UTFPR-FB para realização das análises. Em todas as condições mantidas



nos experimentos, as avaliações microbiológicas iniciaram sete dias após a produção dos queijos, e depois, nos dias quatorze, vinte e um, vinte e oito, trinta e sete, quarenta e quatro, cinquenta e nove e sessenta e quatro, equivalendo a dez semanas de maturação.

As metodologias utilizadas foram as descritas na IN nº 62/2003 (BRASIL, 2003), para as análises de número mais provável de coliformes termotolerantes, contagem de *Staphylococcus* coagulase positiva, presença de *Salmonella* spp. e *Listeria monocytogenes*. Foram também identificadas possíveis cepas de Bactérias do Ácido Lático (BALs) das amostras, que na sequência, foram avaliadas *in vitro* quanto a resistência à 18 tipos de antimicrobianos, pela técnica de disco de difusão em placas conforme - Instituto de Padronização Clínica e Laboratorial (CLSI), utilizando-se como meio sólido o ágar De Man, Rogosa e Sharpe (MRS).

## RESULTADOS E DISCUSSÕES

Nas análises em busca de *Salmonella* spp. foram isoladas 3 cepas suspeitas, mas, após testes específicos o resultado foi de ausência de *Salmonella* spp., assim como na pesquisa por *Listeria*, onde todos os resultados foram negativos para a presença de *Listeria monocytogenes*. Ambos estão em conformidade com a legislação em vigor, que preconiza a ausência desses microrganismos em 25g de amostra (BRASIL, 2022). A presença de *Salmonella* no produto seria um indicador de contaminação por falhas nas boas práticas de fabricação (BPFs), bem como a presença de *Listeria*. São também associados a falhas no processo, contaminação cruzada e a animais no local (FORSYTHE, 2013).

Na análise de Estafilococos, no experimento conduzido no laboratório, os resultados da primeira semana de maturação mostram contagens para queijaria A:  $1,4 \times 10^6$  UFC.g<sup>-1</sup>, queijaria B:  $4,4 \times 10^3$  UFC.g<sup>-1</sup> e queijaria C:  $4,5 \times 10^5$  UFC.g<sup>-1</sup>. Na maturação na queijaria as contagens da 1ª semana foram  $3,9 \times 10^5$ ,  $4 \times 10^5$  e  $8,7 \times 10^4$  UFC.g<sup>-1</sup>, respectivamente. Os resultados das demais semanas estão na Tabela 1.

Tabela 1 – Contagens de Estafilococos em amostras de queijos coloniais artesanais maturados em diferentes condições

Queijarias	Experimento em condições laboratoriais						Experimento in loco			
	Refrigerado			Ambiente			Maturação na queijaria			
	A	B	C	A	B	C	A	B	C	
Semanas	2 <sup>a</sup>	$1,8 \times 10^8$	$< 10^3$	$4,3 \times 10^6$	$1,6 \times 10^7$	$1,0 \times 10^4$	$4,0 \times 10^6$	$8,4 \times 10^6$	$9,1 \times 10^6$	$4,3 \times 10^4$
	3 <sup>a</sup>	$1,1 \times 10^8$	$< 10^3$	$2,3 \times 10^6$	$3,8 \times 10^5$	$1,0 \times 10^4$	$6,0 \times 10^6$	$2,2 \times 10^7$	$8,3 \times 10^5$	$7,3 \times 10^4$
	4 <sup>a</sup>	$1,4 \times 10^6$	$1,8 \times 10^3$	$3,9 \times 10^6$	$1,7 \times 10^5$	$5,8 \times 10^3$	$8,8 \times 10^7$	$2,6 \times 10^7$	$4,3 \times 10^6$	$5,4 \times 10^4$
	5 <sup>a</sup>	$7,9 \times 10^5$	$1,7 \times 10^3$	$3,0 \times 10^6$	$2,1 \times 10^5$	$1,5 \times 10^4$	$1,5 \times 10^6$	$5,6 \times 10^6$	$1,0 \times 10^6$	$7,0 \times 10^4$
	6 <sup>a</sup>	$3,6 \times 10^5$	$2,0 \times 10^3$	$1,0 \times 10^6$	$7,0 \times 10^4$	$1,0 \times 10^6$	$2,6 \times 10^4$	$8,1 \times 10^6$	$1,7 \times 10^7$	$8,1 \times 10^3$
	8 <sup>a</sup>	$9,5 \times 10^4$	$3,2 \times 10^3$	$3,9 \times 10^5$	$1,4 \times 10^7$	$1,0 \times 10^7$	$4,4 \times 10^5$	$1,4 \times 10^7$	$4,9 \times 10^6$	$2,4 \times 10^4$
	10 <sup>a</sup>	$2,3 \times 10^4$	<b><math>7,0 \times 10^2</math></b>	$5,7 \times 10^5$	$1,3 \times 10^6$	$8,8 \times 10^6$	$1,0 \times 10^5$	$2,9 \times 10^7$	$4,2 \times 10^6$	$8,2 \times 10^3$

Valores representados em unidades formadoras de colônias por grama de amostra (UFC.g<sup>-1</sup>).

Fonte: Autoria própria (2023).

Observa-se que em algumas amostras houve aumento do número de estafilococos, ao longo das semanas de maturação. Isso indica que as condições higiênico-sanitárias dessa maturação não proporcionavam a diminuição de contaminação dos produtos, o que deveria ter acontecido por conta das mudanças de pH que ocorrem ao longo da maturação



do queijo. Somente a amostra da queijaria B (em negrito na tabela), apresentou na 10ª semana de maturação, contagens que indicariam produto próprio para consumo, segundo os padrões atuais ( $10^3$  UFC.g<sup>-1</sup> para contagem de *Estafilococos* coagulase positiva) (BRASIL, 2022).

No grupo dos microrganismos *Estafilococos*, há algumas espécies patogênicas, como o *Staphylococcus aureus*, que produzem enterotoxinas termoestáveis, responsáveis por causar intoxicações alimentares. Os estafilococos estão presentes nas vias nasais, na garganta, no cabelo e na pele de 50% ou mais dos indivíduos saudáveis. Como a toxina estafilocócica não pode ser inativada por regimes normais de cocção, evitar a contaminação do alimento pelo microrganismo e mantê-lo em baixas temperaturas são as medidas utilizadas para reduzir a carga microbiana (FORSYTHE, 2013).

Inicialmente, as contagens de coliformes termotolerantes na maturação em laboratório foram de  $3,8 \times 10^5$  NMP.g<sup>-1</sup> na amostra da queijaria A,  $1,4 \times 10^5$  NMP.g<sup>-1</sup> na amostra da queijaria B e  $2,9 \times 10^4$  NMP.g<sup>-1</sup> na amostra da queijaria C. Já na maturação realizada na queijaria, as contagens iniciais foram  $3,6 \times 10^4$ ,  $4,6 \times 10^6$  e  $7,4 \times 10^3$  NMP.g<sup>-1</sup> para as 3 queijarias, respectivamente.

Observou-se ainda que, ao longo da maturação, algumas amostras apresentaram resultados maiores que a microbiota inicial (Tabela 2).

**Tabela 2 – Número mais provável de coliformes termotolerantes em amostras de queijos coloniais artesanais maturados em diferentes condições.**

Queijarias	Experimento em condições laboratoriais						Experimento in loco			
	Refrigerado			Ambiente			Maturação na queijaria			
	A	B	C	A	B	C	A	B	C	
<b>Semanas</b>	2ª	$3,0 \times 10^5$	$1,5 \times 10^5$	$1,5 \times 10^5$	$2,3 \times 10^6$	$1,5 \times 10^5$	$3,6 \times 10^4$	$3,6 \times 10^5$	$9,3 \times 10^6$	$3,6 \times 10^3$
	3ª	$3,6 \times 10^6$	$3,9 \times 10^7$	$3,6 \times 10^3$	$4,4 \times 10^4$	$2,6 \times 10^5$	$7,4 \times 10^5$	$9,2 \times 10^5$	$9,2 \times 10^5$	$1,5 \times 10^2$
	4ª	$7,2 \times 10^5$	$1,5 \times 10^5$	$3,6 \times 10^3$	$2,1 \times 10^5$	$2,1 \times 10^3$	$9,2 \times 10^3$	$2,0 \times 10^6$	$4,3 \times 10^5$	$2,9 \times 10^1$
	5ª	$3,6 \times 10^5$	$3,6 \times 10^5$	$4,3 \times 10^5$	$4,3 \times 10^5$	$9,2 \times 10^4$	$9,3 \times 10^4$	$3,0 \times 10^1$	$2,3 \times 10^5$	$7,4 \times 10^0$
	6ª	$3,6 \times 10^4$	$2,3 \times 10^4$	$9,3 \times 10^3$	$1,1 \times 10^6$	$4,6 \times 10^2$	$9,3 \times 10^5$	$3,0 \times 10^1$	$9,3 \times 10^4$	$9,2 \times 10^0$
	8ª	$9,2 \times 10^3$	$1,2 \times 10^4$	$2,4 \times 10^4$	$2,8 \times 10^6$	$2,3 \times 10^1$	$7,5 \times 10^3$	$3,6 \times 10^1$	$4,3 \times 10^4$	$3,6 \times 10^0$
	10ª	$4,3 \times 10^3$	$2,4 \times 10^3$	$3,6 \times 10^2$	$4,6 \times 10^6$	$9,3 \times 10^1$	$2,4 \times 10^4$	$3,0 \times 10^1$	$3,8 \times 10^3$	$3,0 \times 10^1$

Valores representados em número mais provável por grama de amostra (NMP.g<sup>-1</sup>).

Fonte: Autoria própria (2023).

Apenas as amostras da queijaria B, de temperatura ambiente, tiveram resultados menores que  $5 \times 10^3$  NMP.g<sup>-1</sup> na quarta semana de maturação (limite estabelecido pela legislação atual) (BRASIL, 2022). Na maturação nas próprias queijarias, observou-se valores que atendiam os padrões para este agente já na 2ª semana para amostras da queijaria C, na 5ª semana para amostras da queijaria A e na 10ª semana para amostras da queijaria B.

A presença de coliformes em alimentos é indicador de que o mesmo foi produzido com falhas no uso das BPFs nos processos, uma vez que este grupo de bactérias é indicador de patógenos de origem fecal presentes no alimento. Os coliformes termotolerantes, como cepas de *Escherichia coli*, são capazes de fermentar lactose em meio EC, produzindo gás durante 48 horas a 45,5°C. *E. coli* é a principal espécie no grupo dos coliformes fecais, por isso é considerada a espécie que melhor indica poluição fecal e a possível presença de patógenos entéricos, entre essas bactérias (FORSYTHE, 2013).



As análises microbiológicas ao longo das semanas de maturação possibilitam observar as mudanças nos queijos com o passar do tempo, bem como a influência das condições de maturação e da contaminação inicial na qualidade final do produto. Definir o tempo de maturação ideal significa viabilizar a comercialização de um alimento mais seguro e naturalmente menos contaminado. Essa diminuição da contaminação ocorre devido a alterações no meio em que as bactérias lácteas se encontram, transformando a lactose em ácido lático e elevando a acidez, e pela diminuição da atividade de água no queijo.

Quanto a pesquisa de bactérias lácticas, foram isoladas 81 cepas diferentes, que, após avaliações preliminares e minuciosa triagem bioquímica, foram identificadas pela técnica de MALTI-TOF, e confirmadas serem de 13 diferentes espécies: *Enterococcus faecalis*, *Lactobacillus paracasei*, *Lactococcus garvieae*, *Lactococcus lactis*, *Leuconostoc mesenteroides*, *Bacillus pumilus*, *Lactobacillus mali*, *Enterococcus durans*, *Lactobacillus plantarum*, *Streptococcus uberis*, *Enterococcus faecium*, *Lactobacillus rhamnosus* e *Bacillus sonorensis*.

Ao se avaliar o perfil de resistência a 18 tipos de antimicrobianos, foram observadas as seguintes taxas de resistência: 61% (n=11) para as espécies *Enterococcus faecium*, *Lactobacillus paracasei*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactococcus lactis*, *Leuconostoc mesenteroides*, *Streptococcus uberis*; 55% (n=10) para *Enterococcus faecalis*, *Bacillus pumilus*; 50% (n=9) para *Enterococcus durans*, *Lactobacillus plantarum*, 45% (n=8) para *Lactobacillus mali*, *Bacillus sonorensis* e 39% (n=7) para *Lactococcus garvieae*.

Em relação aos tipos de antibióticos, as 13 cepas foram resistentes: 100% (n=13) para Bacitracina, Ác. Nalidixico e Vancomicina; 93% (n=12) para Tetraciclina, Cefatoxima e Ampicilina; 77% (n=10) para Cefalotina e Amoxicilina; 54% (n=7) para Cefoxitina, Cefepime e Imipenen; 31% (n=4) para Cloranfenicol e Gentamicina; 8% (n=1) para Polimixina e Aztreonam. Nenhuma das espécies testadas apresentaram resistência para Ciprofloxacina, Norfloxacin e Sulfazotim.

Portanto, estas cepas de BALs apresentam relativa capacidade de resistência à maioria dos antimicrobianos testados, indicando um possível benefício tanto na aplicação tecnológica de produção de fermentos lácticos endógenos, quanto para sua funcionalidade como probióticos dos queijos coloniais artesanais do Sudoeste do Paraná.

## CONCLUSÃO

Mesmo na ausência de *Salmonella* spp. e de *Listeria monocytogenes*, nas contagens de Estafilococos e Coliformes termotolerantes observou-se contagens acima do limite permitido, sendo que algumas amostras chegaram a níveis seguros em algumas semanas de maturação, e outras, não chegaram, mesmo as 10 semanas do experimento. Os queijos maturados no verão apresentaram qualidade microbiológica superior.

Concluiu-se as 13 cepas de BALs isoladas destes queijos apresentaram relativa capacidade de resistência à maioria dos antimicrobianos testados, com potencial de aplicação tecnológica como fermentos lácticos endógenos e com possível funcionalidade como probióticos.

As análises desse projeto foram de grande importância para determinar a qualidade e os processos de maturação mais adequados, visando diminuir a contaminação inicial e fornecer produtos mais seguros aos consumidores deste tipo de queijo. A partir desse projeto, também foi possível confirmar como parâmetros de qualidade, assim como



ambientes adequados com padrões previamente estabelecidos, tanto de higiene quanto de produção e com uma temperatura adequada, auxiliam em um queijo mais seguro para o consumo da população em geral, podendo ser um produto de grande comercialização no mercado.

## Agradecimentos

Ao CNPq, à Fundação Araucária e à Cresol de Francisco Beltrão, pelo financiamento recebido e pela concessão de bolsa aos estudantes pesquisadores, permitindo a execução do projeto. À APROSUD pela constante parceria neste projeto. À PROPPG e PROREC da UTFPR, que contribuíram com apoio financeiro e laboratorial para o desenvolvimento científico dessa pesquisa. Agradecimento especial às Queijarias que forneceram as amostras e aceitaram maturar os queijos no experimento in loco.

## Conflito de interesse

Não há conflito de interesse.

## REFERÊNCIAS

BRASIL (2022). Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Instrução Normativa - IN nº 161, de 1º de Julho de 2022. Estabelece os padrões microbiológicos dos alimentos. Publicada no DOU nº 126, de 6 de julho de 2022. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**. 2022.

BRASIL (2003). Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 62, de 26 de agosto de 2003. Métodos microbiológicos para análises microbiológicas em produtos de origem animal. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**. 2003.

CRUZ, F.T.; MENASCHE, R. (2014). O debate em torno de queijos feitos de leite cru: entre aspectos normativos e a valorização da produção tradicional. **Vigilância Sanitária em Debate**, v. 2, p. 34-42, 2014.

FORSYTHE, Stephen J. (2013). **Microbiologia da Segurança dos Alimentos**. [São Paulo]: Artmed Editora LTDA., 2013. E-book. 9788536327068. Disponível em: <https://integrada.minhabiblioteca.com.br/#/books/9788536327068/>.

G1-PR (2021). Paraná produz 4,3 bilhões de litros de leite por ano, diz Deral. **Paraná RPC**, 25 de abril de 2021. Disponível em: Paraná produz 4,3 bilhões de litros de leite por ano, diz Deral | Caminhos do Campo | G1 (globo.com). Acesso em: 5 set. 2023.

SILVA, F.; SILVA, G.; TONIAL, I.B.; CASTRO-CISLAGHI, F.P. (2015). Qualidade microbiológica e físico-química de queijos coloniais com e sem inspeção, comercializados no Sudoeste do Paraná. **Boletim CEPPA**, v. 33, p. 32-44, 2015.