

INFLUÊNCIA DE FERMENTOS ENDÓGENOS NA CINÉTICA DE CRESCIMENTO DE *Listeria innocua* DURANTE A PRODUÇÃO DE QUEIJO ARTESANAL TIPO CANASTRA

Amanda Tavares dos Santos ¹; Raquel Oliveira Medrado Pinto ²; Mariza Landgraf ³;
Cynthia Jurkiewicz Kunigk ⁴

¹ Aluna de Iniciação Científica do Instituto Mauá de Tecnologia (IMT);

² Aluna de Doutorado da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP;

³ Professora da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP;

⁴ Professor do Instituto Mauá de Tecnologia (IMT).

Resumo. O queijo Canastra é produzido com leite cru e um soro fermento natural conhecido como pingo. A utilização de leite cru e o curto tempo de maturação (14 dias) tornam este queijo artesanal uma matriz alimentar com potencial para o crescimento de *L. monocytogenes*, patógeno frequentemente relacionado a surtos de listeriose veiculados por produtos lácteos. Esse trabalho teve como objetivo avaliar a influência de dois pingos, denominados, pingo bom (gera um queijo característico) e pingo ruim (produz estufamento na massa), na multiplicação de *L. innocua*, espécie não patogênica, com comportamento similar à *L. monocytogenes* durante a produção do queijo artesanal em laboratório. Diferentes modelos de crescimento foram ajustados aos dados de contagem, em base úmida e seca, e os parâmetros cinéticos determinados. Os resultados mostraram que o pingo bom apresentou pequeno efeito inibidor no crescimento de *L. innocua* durante a produção do queijo artesanal experimental tipo Canastra, reduzindo a contagem máxima em cerca de 1 Log UFC/g. Entretanto, o pingo ruim não teve efeito significativo na contagem máxima do patógeno e tão pouco na velocidade específica máxima de crescimento. Durante a maturação, que teve início em 24 h, não houve redução significativa na população de *Listeria* até o 14º dia.

Introdução

O Queijo Minas Artesanal (QMA) é tradicionalmente produzido utilizando leite cru, coalho e o “pingo” (cultura iniciadora). As características de textura, aroma e sabor, variam a depender da qualidade e composição do leite cru e do pingo. É de amplo conhecimento, que fatores ambientais, climáticos, assim como a saúde e a alimentação do gado afetam a qualidade do leite e, por consequência, do pingo. O fermento endógeno (pingo) é uma fração de soro recuperada após a última etapa de salga do queijo, que é utilizado na produção do dia seguinte. Muitos produtores de QMA atribuem o sabor diferencial de seus produtos, à qualidade do fermento endógeno. Quando o queijo não está com aspecto e sabor convencional, esse problema é atribuído a qualidade do pingo (IMA, 2013).

A utilização de leite cru e o curto tempo de maturação (14 dias) tornam este queijo artesanal uma matriz alimentar com potencial para o crescimento de *L. monocytogenes*, patógeno que causa infecção em humanos, geralmente em gestantes e em imunocomprometidos. Ao contrário da maioria dos patógenos de origem alimentar, que causam primariamente distúrbios gastrointestinais, a listeriose causa quadros graves e fatais (Souza et al, 2010). Segundos dados do *Centers for Disease Control and Prevention* (CDC), dos Estados Unidos da América, a cada ano, 1.600 pessoas adoecem e 260 morrem devido a ingestão de alimentos contaminados por *L. monocytogenes*. Ressaltam ainda que gestantes têm 10 vezes mais chances de se infectar com esse patógeno ao consumir queijo fresco, produzido com leite cru (CDC, 2016). Tendo em vista esse cenário, é importante avaliar se o fermento endógeno pode ser um fator inibidor de microrganismos patogênicos como a *L.*

monocytogenes durante a produção e maturação do queijo artesanal. Por se tratar de um patógeno, as pesquisas em laboratório que trabalham com grande volume de alimento contaminado, utilizam *Listeria innocua* que tem características semelhantes à *L. monocytogenes*, porém é não patogênica.

Com relação aos defeitos que podem ocorrer no queijo artesanal, alguns grupos de microrganismos podem alterar a textura, aroma e sabor do queijo. Essas alterações podem ser indesejáveis, ocorrendo logo após a produção do queijo ou ao longo do período de maturação. Um dos defeitos que, por vezes, ocorre no queijo artesanal feito com leite cru, é o estufamento tardio, em que há produção de gás e formação de olhaduras grandes no queijo após 5 a 7 dias de maturação. Os microrganismos responsáveis pelos defeitos no queijo podem entrar no processo de produção pelo fermento endógeno, que propagam esses microrganismos de uma produção para outra.

Os modelos cinéticos de crescimento celular são comumente baseados no modelo teórico proposto por Monod, que estabelece as constantes cinéticas que especificam o comportamento do referido microrganismo, geralmente do tipo sigmoidal. No entanto, o referido modelo é muito simples e nem sempre permite obter uma boa representação dos dados de crescimento do microrganismo. Para obter maior ajuste aos dados experimentais, autores como Zwietering et al. (1990) propuseram outros modelos como alternativa ao de Monod; os autores avaliaram diferentes funções sigmoidais e descobriram que estatisticamente a função Gompertz e a função logística descrevem adequadamente o crescimento de microrganismos (Carrillo et al., 2007).

De forma a contribuir com a garantia da segurança e qualidade de queijos artesanais brasileiros, esse trabalho teve como objetivo avaliar a influência de dois diferentes pingos, pingo bom (gera um queijo característico) e pingo ruim (produz estufamento na massa), -no crescimento de *L. innocua*, espécie não patogênica, com comportamento similar à *L. monocytogenes* durante a produção do queijo artesanal em laboratório.

Material e Métodos

Produção dos queijos artesanais

Queijos artesanais experimentais tipo Canastra, com e sem pingo, foram produzidos com leite cru, doado por um laticínio de São Paulo. Dois tipos de pingo, doados por produtores de queijo da Serra da Canastra, foram utilizados. O pingo denominado neste trabalho de “pingo bom” (PB) quando usado na produção do queijo, gerava um produto característico com os padrões esperado, ou seja, uma massa uniforme sem olhaduras. Por outro lado, o pingo denominado “pingo ruim” (PR), produzia estufamento dos queijos a partir do sétimo dia de maturação. A produção dos queijos foi realizada em trabalho anterior do grupo de pesquisa (Pinto, Raquel et al).

Os queijos foram produzidos na Planta Piloto de Alimentos e no laboratório de Microbiologia de Alimentos do Instituto Mauá de Tecnologia. Primeiramente o leite foi pré-aquecido a 63°C por 5 minutos, pois como esse leite não era utilizado assim que coletado, como acontece nas produções rurais, a contagem microbiológica provavelmente estaria elevada. Após o pré-aquecimento do leite foi resfriado a 38°C e contaminado com duas linhagens (CLIST 4530 e UFG) de *L. innocua* (10^2 UFC/ml), isoladas de produtos lácteos, e adicionado do pingo e do coalho líquido (CLERICI). Queijos sem pingo foram produzidos como controle. Após 50 minutos em repouso para ação do coalho e formação da coalhada, a massa foi cortada manualmente com auxílio de uma escumadeira para obtenção de cubos de aproximadamente 1,5 cm de aresta, para a dessora. A massa foi mantida em repouso por mais 10 min e então é feita a dessoragem. A massa coagulada foi coletada com o auxílio de uma peneira plástica e transferida para formas plásticas circulares, com 100 mm de diâmetro e 70 mm altura, contendo um tecido sintético próprio para dessora de queijo. A prensagem foi

realizada manualmente visando a retirada do excesso de soro. A primeira salga (1,5 % de sal em relação a massa de queijo) foi realizada após a prensagem em um dos lados do queijo, e a segunda salga depois de 6 horas, no lado oposto. Após 12 h da segunda salga, os queijos foram colocados em superfície de madeira e transferidos para câmara climática (Ethiktecnology) para maturação em condições controladas de temperatura (20 °C) e umidade (65 % UR) por 56 dias. As produções dos queijos com pingo bom (QPB) e ruim (QPR) foram realizadas em duplicata e sem pingo (QSP) em triplicata.

Metodologia analítica

A população de *Listeria innocua*, a umidade e a acidez dos queijos foram determinadas durante a produção e até o 56º dia de maturação.

A enumeração de *L. innocua*, foi determinada em trabalho anterior do grupo de pesquisa, de acordo com metodologia BAM/FDA (2017).

A umidade do leite e dos queijos foi determinada de acordo com AOAC 990.19 e 948.12, respectivamente (AOAC, 2011). Amostras de 2 a 3 g do queijo triturado ou 3 g do leite foram pesadas em cápsulas de porcelana que foram colocadas em banho maria para a pré secagem, no caso do leite, até não haver mais líquido livre se movimentando. Em seguida as cápsulas foram colocadas em uma estufa com circulação de ar (Tecnal) a 130°C por 1,25 h para os queijos e a 100°C por 3 h para os leites, resfriadas em dessecador e a massa determinada. As cápsulas foram colocadas por mais 30 min na estufa, resfriadas e a massa determinada novamente. O processo de secagem foi repetido até se atingir massa constante, com variação de 0,01 g.

A acidez do leite e dos queijos foi determinada de acordo com AOAC 947.05 e 920.124, respectivamente (AOAC, 2011). Amostras de 20 g de leite, foram transferidas para Erlenmeyers de 150 mL e 40 mL de água destilada foram adicionados. Para os queijos, foi necessário inicialmente triturá-los, em seguida, 10 g foram pesados em um béquer de 200 mL e misturado com 100 mL de água destilada a 40 °C. A mistura foi filtrada em papel de filtro qualitativo, e 25 mL do filtrado foi transferido para Erlenmyer de 150 mL. A titulação das amostras contidas nos Erlenmeyers foi realizada com NaOH 0,1 M, utilizando fenolftaleína como indicador. A acidez foi expressa em % de ácido láctico.

Ajuste de modelos de crescimento microbiano

As contagens de *L. innocua* até o 14º dia de maturação foram transformadas em ln UFC/g de amostra úmida e ln UFC/g de amostra seca, considerando a umidade das amostras coletadas durante a produção e maturação dos queijos. Três modelos de crescimento foram ajustados: modelo logístico, sem fase lag (Eq. 1); modelo de Baranyi com h_0 livre (Eq. 2 e 3); e modelo de Gompertz (Eq. 4). Os ajustes foram realizados utilizando a ferramenta Solver, pelo método GRG (Gradiente Reduzido Generalizado) não linear, Microsoft Excel. Além disso, com o objetivo de comparar os parâmetros de cada modelo obtidos pelo Solver, foi utilizado um aplicativo para ajuste de modelos de microbiologia, Integrated Pathogen Modeling Program (IPMP) (Huang, 2013).

$$Y(t) = Y_0 + Y_{max} - \ln[e^{Y_0} + (e^{Y_{max}} - e^{Y_0}) \cdot e^{-\mu_{max} \cdot t}] \quad \text{Eq. 1}$$

$$Y(t) = Y_0 + \mu_{max} \cdot A(t) - \ln \left\{ 1 + \frac{\exp[\mu_{max} \cdot A(t)] - 1}{\exp(Y_{max} - Y_0)} \right\} \quad \text{Eq. 2}$$

$$A(t) = t + \frac{1}{\mu_{max}} \cdot \ln[\exp(-\mu_{max} \cdot t) + \exp(-h_0) - \exp(-\mu_{max} \cdot t \cdot h_0)] \quad \text{Eq. 3}$$

$$Y(t) = Y_0 + (Y_{max} - Y_0) \cdot \exp \left\{ -\exp \left[\frac{\mu_{max} \cdot e}{Y_{max} - Y_0} (\lambda - t) + 1 \right] \right\} \quad \text{Eq. 4}$$

Em que: Y_0 , $Y_{m\acute{a}x}$ e $Y(t)$ representam a população de *L. innocua*, em ln UFC/g, no instante inicial, máxima e no tempo t (horas), respectivamente; μ_{max} é a velocidade específica máxima de crescimento (h^{-1}); h_0 é parâmetro relacionado ao estado fisiológico inicial do microrganismo; t é o tempo de cultivo (h ou min); e é o número de Euler (aproximadamente 2,718); λ é a duração da fase lag.

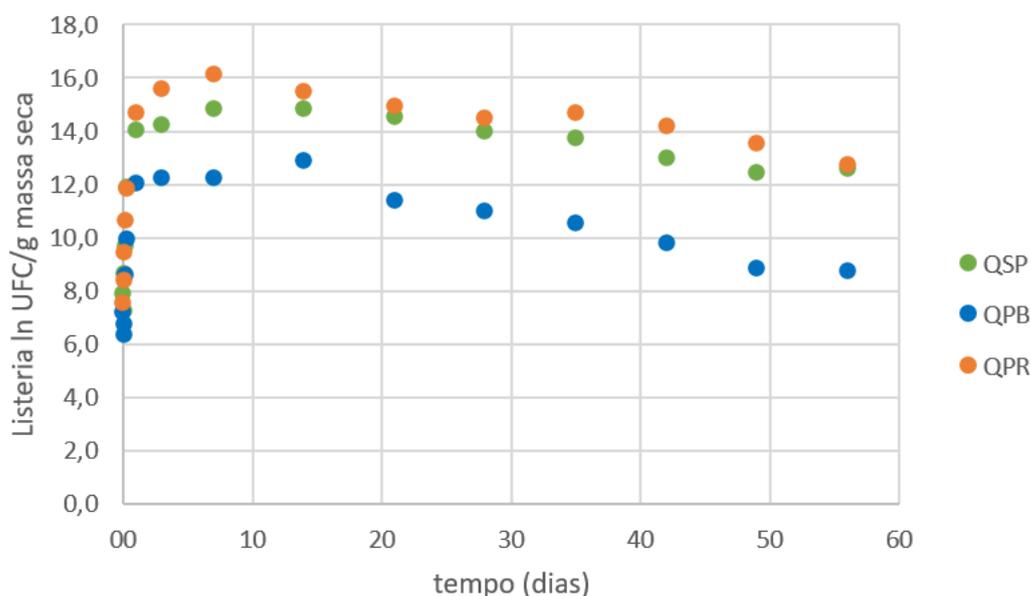
Análise estatística

Os resultados das contagens foram comparados por ANOVA e teste de Dunnett para comparação das médias, considerando um nível de significância de 10 %. Os parâmetros dos modelos obtidos a partir dos resultados das contagens microbiológicas em base seca e úmida foram comparados utilizando o teste t para dados emparelhados e um nível de 5 % de significância.

Resultados e Discussão

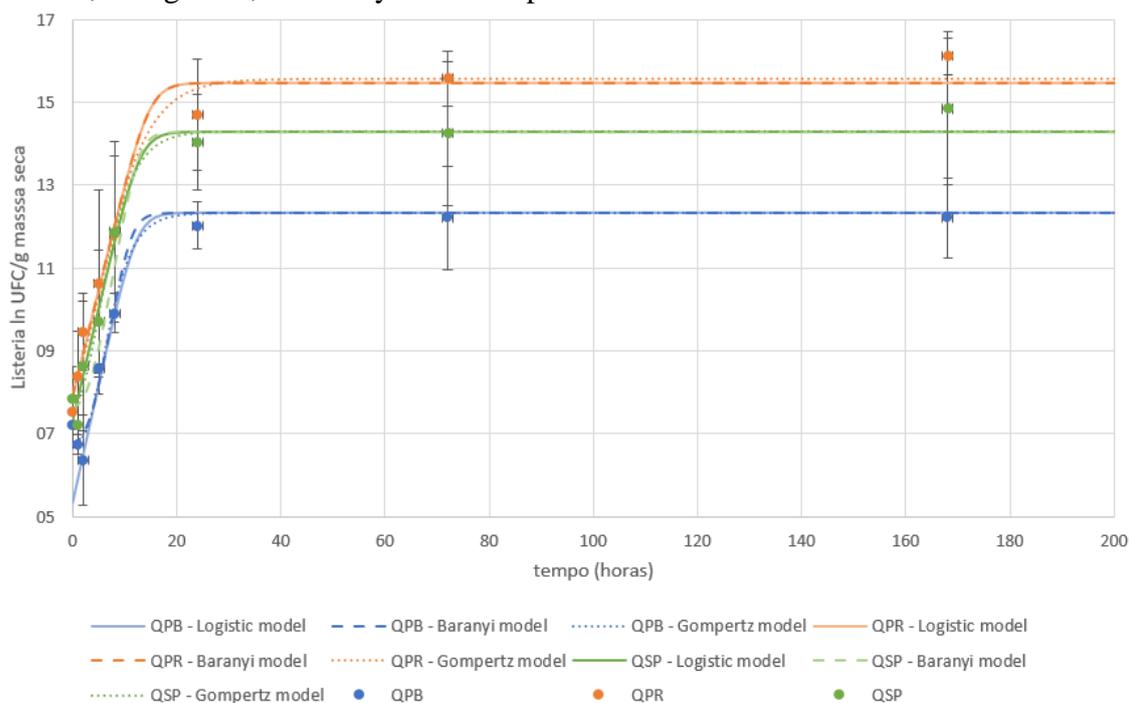
A Figura 1 mostra as contagens de *L. innocua*, em base seca, desde o início da produção até o 56o dia de maturação. O maior crescimento do microrganismo foi observado durante a produção do queijo, ou seja, até o primeiro dia. As máximas contagens são atingidas por volta do 7o dia, durante a maturação. O aumento da população de *L. innocua* nas primeiras 24 h foi de $2,7 \pm 0,3$ log UFC/g; $3,7 \pm 0,3$ log UFC/g e $3,3 \pm 0,2$ log UFC/g, nos queijos com pingo bom (QPB), queijos com pingo ruim (QPR) e queijo sem pingo (QSP), respectivamente. O teste de Dunnett, mostrou um menor aumento da população de *Listeria* ($p < 0,1$) em 24 h nos queijos com pingo bom e relação aos queijos sem pingo (controle), entretanto quando o pingo ruim foi utilizado, o aumento da população em 24 h não diferiu significativamente do controle ($p > 0,1$). Após o 14o dia, observa-se uma redução da população do patógeno, que atingiu no 56o dia, $3,8 \pm 0,2$ log UFC/g, $5,5 \pm 0,3$ log UFC/g e $5,3 \pm 0,8$ log UFC/g nos queijos QPB, QPR e QSP, respectivamente. As contagens finais de *Listeria* foram significativamente ($p < 0,1$) menores no queijo com pingo bom em relação aos queijos sem pingo, mas não diferiram significativamente ($p > 0,1$) entre os queijos com pingo ruim e o controle.

Figura 1 – População de *Listeria innocua* em ln UFC/g em base seca durante a produção e maturação dos queijos com pingo bom (CPB), com pingo ruim (CPR) e sem pingo (SP)



A Figura 2 mostra as contagens de *L. innocua* em base seca durante os sete primeiros dias de produção dos queijos experimentais e os ajustes dos três modelos. As máximas contagens da bactéria são atingidas antes de 20 h, cerca de 6,4 Log UFC/g nos queijos sem pingo, 6,7 Log UFC/g nos queijos com pingo ruim e 5,4 Log UFC/g nos queijos com pingo bom, mostrando o rápido crescimento do microrganismo nas condições simuladas de produção do queijo artesanal. Durante a maturação, que teve início em 24 h, não houve redução significativa na população de *Listeria* até o 14º dia.

Figura 2 – População de *Listeria innocua* em ln UFC/g em base seca durante a produção dos queijos com pingo bom (QPB), com pingo ruim (QPR) e sem pingo (QSP) e os ajustes dos modelos, A-logístico, B-Baranyi e C-Gompertz.



A Tabela 1 mostra os parâmetros cinéticos obtidos a partir dos três modelos ajustados. Todos os modelos de crescimento avaliados apresentaram bons ajustes aos dados experimentais, com R^2 variando entre 0,78 e 0,93. Os valores das contagens máximas de *L. innocua* ($Y_{m\acute{a}x}$) nos queijos com pingo bom (QPB), 12,3 Ln UFC/g, foram significativamente menores que nos queijos sem o fermento endógeno (QSP). Entretanto, os queijos com pingo ruim (QPR) apresentaram contagens de *Listeria* semelhantes aos queijos sem pingo. Por outro lado, a velocidade específica máxima de crescimento da bactéria ($\mu_{m\acute{a}x}$) não foi influenciada significativamente ($p > 0,05$) pela presença do pingo.

Tabela 1 – Contagem máxima de *L. innocua* ($Y_{m\acute{a}x}$), velocidade específica máxima de crescimento ($\mu_{m\acute{a}x}$) e coeficiente de determinação (R^2) em base seca, obtidos a partir dos diferentes modelos.

Modelo	R^2			Y_{max} (ln UFC/g)			μ_{max} (h^{-1})		
	QSP	QPB	QPR	QSP	QPB	QPR	QSP	QPB	QPR
Logístico	0,84	0,78	0,90	14,28 ^A	12,33 ^B	15,46 ^A	0,54 ^A	0,57 ^A	0,52 ^A
Baranyi	0,80	0,92	0,90	14,92 ^A	12,33 ^B	15,46 ^A	0,71 ^A	0,72 ^A	0,52 ^A
Gompertz	0,80	0,92	0,93	15,00 ^A	12,32 ^B	15,56 ^A	0,58 ^A	0,65 ^A	0,55 ^A

^{A, B} – médias com letras iguais na mesma linha, para o mesmo parâmetro, não diferem significativamente ($p < 0,05$).

Os ajustes dos modelos considerando os resultados das contagens em base seca permitem estimar os verdadeiros parâmetros cinéticos, ou seja, decorrentes do aumento da população de *Listeria* devido apenas à multiplicação do microrganismo no produto. Por outro lado, quando o ajuste dos resultados das contagens de *Listeria* é realizado em base úmida, o aumento da população da bactéria é decorrente também da redução do teor de água durante a produção e maturação do queijo. De forma a comparar os parâmetros cinéticos obtidos com os dados em base seca e úmida, os modelos também foram ajustados aos resultados das contagens em base úmida (Figura 3 e Tabela 2). Os três modelos de crescimento avaliados apresentaram bons ajustes aos dados experimentais, em base úmida, com R^2 variando entre 0,83 e 0,94. Os valores das contagens máximas de *L. innocua* ($Y_{m\acute{a}x}$) nos queijos foram menores que os obtidos com os dados em base seca, o que era esperado, já que a massa de queijo úmido é maior. Com relação ao parâmetro $\mu_{m\acute{a}x}$, os valores obtidos a partir dos ajustes dos dados em base seca foram significativamente menores ($p < 0,05$) que os valores obtidos com os dados em base úmida. Esses resultados mostram a importância de se considerar a população do patógeno em base seca para fins de obtenção de parâmetros cinéticos de crescimento microbiano.

Os parâmetros estimados em base úmida (Tabela 2) apresentaram o mesmo comportamento verificado para aqueles estimados com os dados em base seca (Tabela 2), ou seja, a contagem máxima de *Listeria* foi significativamente menor nos queijos com pingo bom (QPB) em relação aos queijos com pingo ruim (QPR) e os queijos sem pingo (QSP). Já a velocidade específica máxima de crescimento da bactéria não foi influenciada pela presença do pingo.

Figura 3 – População de *Listeria innocua* em ln UFC/g em base úmida durante a produção dos queijos com pingo bom (QPB), com pingo ruim (QPR) e sem pingo (QSP) e os ajustes dos modelos, A-logístico, B-Baranyi e C-Gompertz.

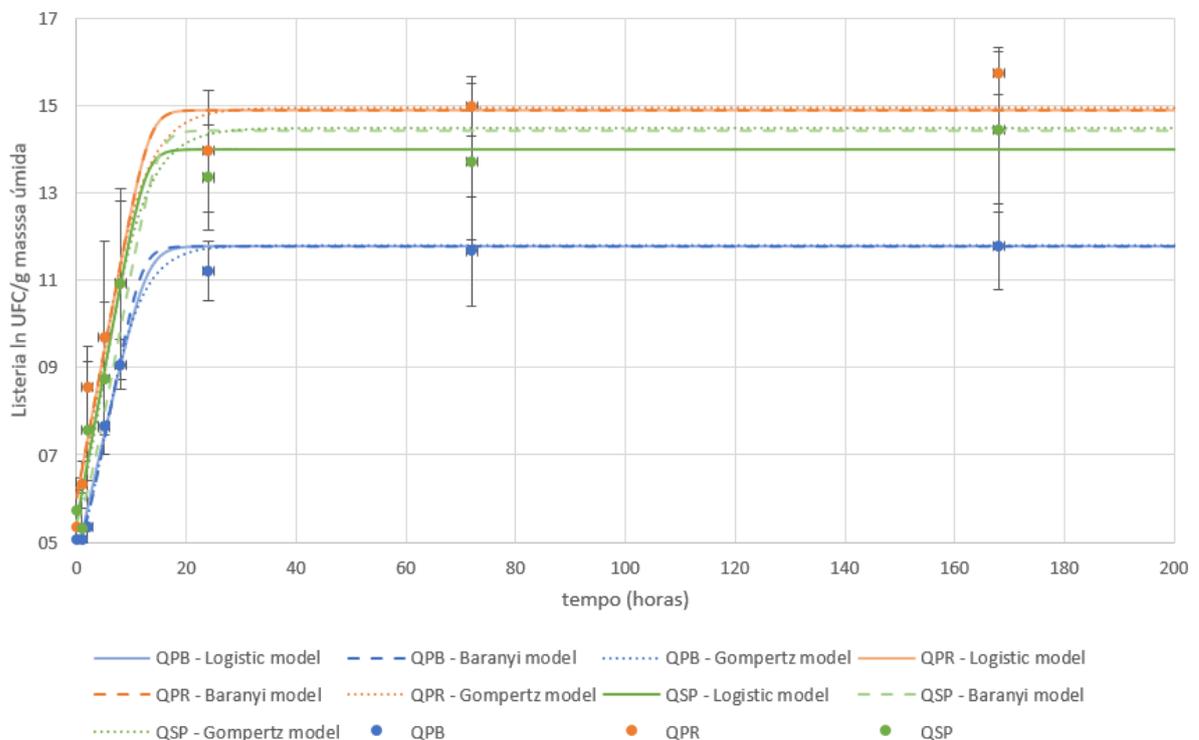


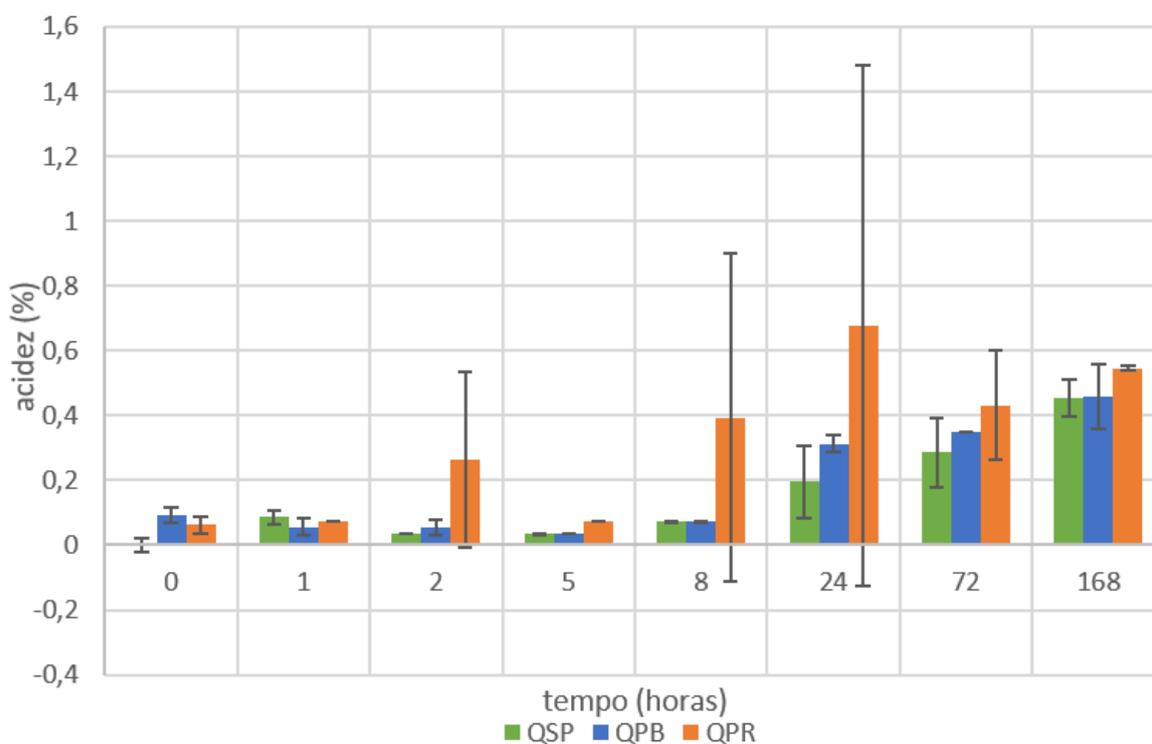
Tabela 2 – Contagem máxima de *L. innocua* (Y_{\max}), velocidade específica máxima de crescimento (μ_{\max}) e coeficiente de determinação (R^2) em base úmida, obtidos a partir dos diferentes modelos.

Modelo	R^2			Y_{\max} (ln UFC/g)			μ_{\max} (h^{-1})		
	QSP	QPB	QPR	QSP	QPB	QPR	QSP	QPB	QPR
Logístico	0,88	0,94	0,88	13,99 ^A	11,78 ^B	14,89 ^A	0,68 ^A	0,56 ^A	0,67 ^A
Baranyi	0,83	0,94	0,83	14,42 ^A	11,77 ^B	14,89 ^A	0,68 ^A	0,68 ^A	0,67 ^A
Gompertz	0,83	0,94	0,83	14,48 ^A	11,80 ^B	14,94 ^A	0,74 ^A	0,64 ^A	0,74 ^A

^{A, B} – médias com letras iguais na mesma linha, para o mesmo parâmetro, não diferem significativamente ($p < 0,05$).

A Figura 4 mostra a porcentagem de ácido láctico durante a produção dos queijos. O queijo que apresentou a maior acidez foi o produzido com pingo ruim, enquanto os queijos com pingo bom e sem pingo apresentaram acidez semelhante ao longo de sete dias. Esses resultados mostram que a inibição do crescimento de *Listeria innocua* durante a produção dos queijos não foi causada pelo ácido láctico, pois o queijo com pingo ruim (QPR), que apresentou a maior contagem de *L. innocua* também foi o queijo com a maior porcentagem de ácido láctico.

Figura 4 – Porcentagem de ácido láctico durante a produção dos queijos com pingo bom (QPB), com pingo ruim (QPR) e sem pingo (QSP).



Conclusões

O fermento endógeno (pingo bom) apresentou pequeno efeito inibidor no crescimento de *L. innocua* durante a produção do queijo artesanal experimental tipo Canastra, reduzindo a contagem máxima do patógeno em cerca de 1 Log UFC/g, enquanto o pingo ruim não

apresentou influência no crescimento da bactéria. A adição de pingo não teve efeito significativo na velocidade específica máxima de crescimento. Também foi constatado que o efeito inibidor de *L. innocua* verificado para o pingo bom não foi decorrente da produção de ácido láctico. Esses resultados mostram a importância do controle de *Listeria* no leite cru, já que durante a produção do queijo artesanal não há barreiras efetivas para evitar seu crescimento.

Referências Bibliográficas

- AOAC. Official methods of analysis of AOAC international. 18^a. ed. Maryland: The Scientific Association Dedicated to Analytical Excellence, 2011.
- BAM/FDA - **Bacteriological Analytical Manual**. Hitchins, A. D.; Jinneman, K.; Chen, Y. *Listeria monocytogenes*. Cap. 10. 2017.
- Baranyi, J. and Roberts, T.A. 1995. Mathematics of predictive microbiology. International Journal of Food Microbiology, 26, 199 – 218.
- CDC. Centers for Disease Control and Prevention. **Listeria (Listeriosis)**. Disponível em: <https://www.cdc.gov/listeria/index.html>.
- Center for Food Safety and Applied Nutrition. “Listeria (Listeriosis).” U.S. Food and Drug Administration, FDA, <https://www.fda.gov/food/foodborne-pathogens/listeria-listeriosis>.
- Diana M. Vanegas e Margarita E. Ramírez. **Inf. tecnol. vol.27 no.2 La Serena 2016**. Correlação do Crescimento de *Pseudomonas fluorescens* na Produção de Polihidroxialcanoatos de Cadeia Média (PHA_{MCL}) Utilizando Modelos Primários Gompertz, Logístico e Baranyi. https://www.scielo.cl/scielo.php?pid=S0718-07642016000200011&script=sci_arttext&tlng=en
- Fang, T., Liu, Y., and Huang, L. 2013. Growth kinetics of *Listeria monocytogenes* and spoilage microorganisms in fresh-cut cantaloupe. Food Microbiology, 34, 174 – 181.
- Huang, L. USDA Integrated Pathogen Modeling Program (/Main/docs.htm?docid=23355). **USDA Agricultural Research Service, Eastern Regional Research Center**, Wyndmoor, PA, 2013.
- INSTITUTO MINEIRO DE AGROPECUÁRIA. **Portaria nº 1305, de 30 de abril de 2013**. Estabelece diretrizes para a produção do queijo minas artesanal. Disponível em: http://www.ima.mg.gov.br/portarias/doc_details/1159-portaria-1305.
- Pinto, Raquel et al. FoodMicro 2022. Assessing the behaviour of *Listeria innocua* in a model of artisanal Canastra cheese during manufacturing and ripening. P1.60.
- Souza, Ana Paula Oliveira de, et al.2010. “Listeriose Na Gravidez.” Listeriose Na Gravidez, <http://www.rmmg.org/artigo/detalhes/1181>.
- Viviane da Cruz Rafael.2017. Fenótipos da microbiota predominante do fermento endógeno (pingo) relevantes para as características e segurança microbiológica do queijo minas artesanal da Serra da Canastra. <https://www.locus.ufv.br/handle/123456789/17195>
- Zwietering, M.H., Jongenburger, I., Rombouts, F.M., and van't Riet, K. 1990. Modeling of the bacterial growth curve. Applied and Environmental Microbiology, 56, 1875 – 1881