

Uso da metagenômica na identificação dos principais contaminantes do queijo minas artesanal: uma revisão sistemática da literatura.

Letícia Aparecida Cruvinel ⁽¹⁾; Neimar Freitas Duarte ⁽²⁾; Gustavo Augusto Lacorte ⁽³⁾

⁽¹⁾Estudante de Mestrado. Instituto Federal Minas Gerais (IFMG) *campus* Bambuí. Rod. Bambuí/Medeiros km 5. CEP: 38900-000. Bambuí-MG. ⁽²⁾ Professor – IFMG. ⁽³⁾ Professor Orientador – IFMG.

RESUMO - Uma das principais e mais tradicionais culturas brasileiras consiste na produção de queijos artesanais, entretanto, muitas vezes os métodos de higiene e fabricação desse produto seguem técnicas rudimentares e precárias condições de distribuição e manipulação, fatores que somado as características do produto o torna susceptível a contaminações, o que pode acarretar em doenças toxialimentares, além de causar prejuízo financeiro. A identificação desses contaminantes é de extrema importância, tendo em vista que abre portas para estudos que visam o controle dos mesmos. Vários métodos possibilitam sua identificação, entretanto os métodos tradicionais muitas vezes são trabalhosos e falhos. Com isso, foi realizado um estudo de revisão sistemática visando reunir conhecimento sobre os principais contaminantes do queijo minas artesanal, bem como avaliar a eficiência do uso da metagenômica para identificação desses contaminantes. Com o estudo foi possível perceber que técnicas moleculares são de grande eficiência na detecção de microrganismos presentes em queijos artesanais; na grande maioria das vezes essas técnicas detectam com uma maior facilidade e rapidez microrganismos quando comparadas com técnicas tradicionais.

INTRODUÇÃO

Uma das principais e mais tradicionais culturas brasileiras consiste na produção de queijos artesanais, tradição que iniciou com a chegada dos portugueses no Brasil. Minas Gerais se destaca como o mais importante estado produtor do país, com cerca de 27 mil produtores totalizando uma produção anual de 70 mil toneladas/ano. As principais regiões mineiras caracterizadas como produtoras do queijo minas artesanal estão localizadas nas regiões da Serra da Canastra, Serro, Alto Paranaíba e Araxá (EMATER, 2004).

Segundo o artigo 1º da lei estadual número 14185 de 31 de Janeiro de 2002 considera queijo minas artesanal aquele confeccionado conforme a tradição histórica e cultural da região do Estado onde for produzido, a partir de leite integral da vaca, fresco e cru, retirado e beneficiado na propriedade de origem, que apresente consistência firme, cor e sabor próprios, massa uniforme, isenta de corantes e conservantes, com ou sem olhaduras mecânicas. O queijo minas canastra é uma

VIII Semana De Ciência E Tecnologia do IFMG- *campus* Bambuí

I Seminário dos Estudantes de Pós-Graduação

garantia de sustentabilidade familiar. Economicamente, o queijo desta região tem um significado expressivo, sendo a principal renda e emprego para os agricultores da região (Silva, 2007). Porém, muitas vezes os métodos de higiene e fabricação desses queijos seguem técnicas rudimentares e precárias condições de distribuição e manipulação (SEBRAE, 1997).

Os queijos apresentam uma elevada umidade e alto teor de nutrientes, características que somadas com o fato do produto ser gerado através de massa crua e muitas vezes sem a higienização adequada na produção o torna um alimento susceptível a contaminações, o que pode acarretar em doenças toxialimentares, além de causar prejuízo financeiro, comprometendo a qualidade e prazo de validade do produto (Loguercio & Aleixo, 2001).

Para o queijo artesanal os principais contaminantes são *Escherichia coli*, *Salmonella Typhimurium*, *Listeria monocytogenes*, entre outros.

As formas mais tradicionais de identificação desses contaminantes ainda são voltadas para técnicas de cultura, isolamentos bacteriológicos, testes bioquímicos e exame morfológico. Porém essa forma de identificação de microrganismos acaba por ser falha, tendo em vista que detecta apenas microrganismos facilmente cultiváveis, sendo que microrganismos que crescem em meios específicos ou mesmo possuem condições de crescimento desconhecidas acabam não sendo identificados, além de serem técnicas que demandam tempo para o diagnóstico (Jovicic et al. 2004). Outra problemática dessas técnicas é o fato de que na grande maioria das vezes não é possível identificar microrganismos em nível de espécies (Bej et al., 1990; Kreader, 1995; Rand et al., 1975; Wren, 1991).

Em contrapartida a metagenômica vem ganhando destaque na identificação desses microrganismos, onde através do sequenciamento de regiões gênicas conservadas é possível identificar os microrganismos presentes em uma amostra, de forma rápida e eficiente.

Com isso o presente trabalho teve como objetivo reunir conhecimento sobre os principais contaminantes do Queijo Minas Artesanal (QMA), bem como avaliar a eficiência do uso da metagenômica para identificação de seus contaminantes. Para tal foi realizada uma busca na literatura por trabalhos que usaram essa metodologia, através de um estudo de revisão sistemática.

Segundo Volpato (2011) a revisão enquanto artigo científico é o que chamam de revisão sistemática, embora o autor prefira chamar de revisão crítica. Segundo ele, nesse tipo de revisão o autor usa resultados e conclusões de artigos específicos para construir novas generalizações.

Para seleção dos estudos foram feitas buscas nas principais plataformas de buscas acadêmicas, Sendo que a busca dividida em 5 etapas, sendo: (1) Pesquisa de palavras-chaves nas plataformas; (2) Leitura de Títulos; (3) Leitura de Resumos e Conclusões; (4) Leitura das

VIII Semana De Ciência E Tecnologia do IFMG- campus Bambuí
I Seminário dos Estudantes de Pós-Graduação

referências selecionados na etapa 3. As palavras chave escolhidas foram: Queijo artesanal, contaminação biológica, metagenômica.

DESENVOLVIMENTO

As referências selecionadas para análise foram: Artigo 1 (A1)- “Avaliação da microbiota bacteriana do queijo de coalho artesanal produzido na região Agreste do estado de Pernambuco” Autoria de Silva et al. (2012); A2- “Avaliação da qualidade microbiológica do queijo-de-minas artesanal do Serro-MG” autoria de Blant et al. (2007); A3- “Microbiologia de queijo tipo Minas Frescal produzido artesanalmente”, autoria de Loguercio & Aleixo (2001), e a tese T1- “Identificação de espécies de *Enterococcus* isoladas de Queijo Minas tipo frescal através da análise do polimorfismo dos Fragmentos de restrição de parte do gene 16s rRNA Amplificado pela PCR” autoria de Scheidegger (2009).

Os resultados do artigo A1 mostraram a eficiência da técnica molecular na identificação de contaminantes, visto que todos os gêneos e espécies testados foram encontrados. Sendo que os alvos dos primers: *Enterococcus*, *Enterococcus faecium*, *Enterococcus faecalis*, *Streptococcus thermophilus*, *Lactococcus lactis*, *Lactococcus raffinolactis* e *Lactobacillus casei*. Um fato interessante sobre o trabalho foi atribuir o sabor diferenciado do produto a heterogeneidade da microbiota ácido-láctica presentes no mesmo.

A tese um (T1) demonstrou que a técnica da PCR/RFLP mostrou-se simples, eficiente e rápida, para a identificação das espécies de *Enterococcus*. Nesse trabalho a autora usou também testes bioquímicos com intuito de reforçar os resultados, primeiramente foram usados as duas técnicas em isolados bacterianos da coleção laboratorial, onde a técnica molecular foi capaz de identificar os isolados, entretanto algumas provas bioquímicas não coincidiram com a literatura disponível estabelecida para isolados, dificultando a interpretação dos resultados, sendo que em alguns casos não foi possível identificar as espécies. Quando as duas técnicas foram aplicadas em isolados do QMA ambas foram capazes de identificar as espécies, entretanto a técnica bioquímica demonstrou alguns perfis atípicos entre as amostras.

Já o artigo 2 (A2), avaliando a presença de *Staphylococcus* coagulase positiva, *Salmonella* spp. e *Listeria monocytogenes*, usando técnicas tradicionais de identificação demonstrou que 92,5% das amostras analisadas estavam fora do padrão, onde 82,5% apresentaram contagens de *Staphylococcus* coagulase positiva acima de 10^3 UFC/grama, e nenhuma amostra de queijo apresentou contaminação por *Salmonella* spp ou *Listeria monocytogenes*. Entretanto, como mostra a T1 as vezes as técnicas tradicionais dificultam a identificação de contaminantes a nível de espécies, e talvez por isso esses dois contaminantes não foram identificados.

VIII Semana De Ciência E Tecnologia do IFMG- *campus* Bambuí
I Seminário dos Estudantes de Pós-Graduação

O artigo 3 (A3) demonstrou que na determinação de coliformes fecais, 28 amostras (93,33%) apresentaram fora dos padrões legais exigidos. Na contagem de *S. aureus*, em 29 amostras (96,67%) obteve-se valores superiores a 10^3 ufc/g, estando apenas 1 amostra (3,33%) em conformidade com o padrão legal. Porém o que é relevante neste trabalho seria o objetivo, onde visava avaliar a qualidade higiênico-sanitária do queijo Minas Frescal produzido artesanalmente e comercializado em Cuiabá, através da investigação da carga de microrganismos indicadores, entretanto o trabalho só dá destaque a dois tipos de contaminantes, coliformes e *S. aureus*, que não podem ser usados como representantes da microbiota do produto.

Trabalhos que intercalem as duas metodologias seriam ideais para destacar a eficiência dos métodos que usem a metagenômica como base, porém os mesmos são escassos na literatura. Entretanto podemos perceber com o presente trabalho que técnicas que utilizam ferramentas genéticas são rápidas e eficientes na identificação de microrganismos, embora ainda sejam pouco usadas. Um dos motivos para essas técnicas não serem usadas em primeira instância deve se ao fato de que materiais e aparelhos para tal possuem elevado custo, sendo que muitas vezes estão fora da realidade da instituição.

Queijos artesanais possuem naturalmente uma flora bacteriana, sendo que a interação desses microrganismos é de grande importância no processo de maturação do produto, bem como são responsáveis pelo sabor e textura desse alimento (Silva et al. 2012). Outros autores também citam a importância da interação entre microrganismos na formação de produtos artesanais, como Kongo et al. (2007).

Usando técnicas mais eficientes de identificação de microrganismos, juntamente com a seleção de produtos de boa e duvidosa qualidade é possível identificar quais microrganismo são importantes e benéficos para o produto, bem como aqueles que dever ser combatido. Essa também é uma ferramenta importante para o desenvolvimento de produtos que afetem somente microrganismos prejudiciais.

CONCLUSÃO

Com o presente estudo podemos concluir que técnicas moleculares são de grande eficiência na detecção de microrganismos presentes em queijos artesanais, na grande maioria das vezes essas técnicas detectam com uma maior facilidade e rapidez microrganismos quando comparadas com técnicas tradicionais. Outro fator relevante é o fato de que essas novas técnicas permitirem a identificação de microrganismos que não seriam identificados em técnicas tradicionais, por não terem uma biologia conhecida ou mesmo crescimento lento, que muitas vezes dificulta seu crescimento em meio de cultura.

VIII Semana De Ciência E Tecnologia do IFMG- *campus* Bambuí
I Seminário dos Estudantes de Pós-Graduação

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BEJ, A.K., STEFFAN, R.J., DICESARE, J., HAFF, L., ATLAS, R.M. (1990). Detection of coliform bacteria in water by polymerase chain reaction and gene probes. *Appl Environ Microbiol*, 56, 307-14.
- BRANT, L. M. F., FONSECA, L. M., SILVA, M. C. C. (2007). Avaliação da qualidade microbiológica do queijo-de-minas artesanal do Serro-MG. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, 59(6),1570–1574.
- JOVCIC, B. NATASA, K., KOJIC, M., TOPISIROVIC, L.J. (2011). Molecular characterization of semi-hard homemade cheese microflora. *Acta Veterinaria (Beograd)*, 63(4), 1057–1067.
- KONGO, J.M., HO, A.J., MALCATA, F.X. (2007). Characterization of dominant lactic acid bacteria isolated from São Jorge cheese, using biochemical and ribotyping methods. *J. Appl. Microbiol.*, 103, 1838-1844.
- KREADER, C. A. (1995). Design and evaluation of *Bacteroides* DNA probes for the specific detection of human faecal pollution. *Appl Environ Microbiol*, 61, 1171-9.
- LOGUERCIO, A. P., ALEIXO, J. A. G. (2001). Microbiologia de queijo tipo Minas Frescal produzido artesanalmente. *Ciência Rural*, 31 (6), 1063–1067.
- RAND, M.C. (1975). Standard methods for the examination of water and wastewater. American Public Health Association, Washington, D.C. 879- 920.
- SCHEIDEGGER, E. M. D. (2009). Identificação de espécies de *enterococcus* isoladas de queijo minas tipo frescal através da análise do polimorfismo dos fragmentos de restrição de parte do gene 16s RRNA amplificado pela PCR (Dissertação de Mestrado). Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, RJ.
- SILVA, J. G. (2007). Características físicas, físico químicas e sensoriais do queijo minas artesanal da Canastra (Dissertação de Mestrado). Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.
- SILVA, R. A (2012). Avaliação da microbiota bacteriana do queijo de coalho artesanal produzido na região Agreste do estado de Pernambuco. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.* 64(6), 1732–1738.
- VOLPATO, G (2011). Bases teóricas para redação científica. 3.ed. São Paulo. Cultura Academica e Scripta (ed.), 125p.
- WREN, M. W. D. (1991). Laboratory diagnosis of anaerobic infection, In B. I. Duerden and B. S. Drasar (ed.), *Anaerobes in human disease* (180-196). Wiley-Liss, New York.