

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
ESCOLA DE VETERINÁRIA
Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal**

Luciana Albuquerque Caldeira Rocha

**CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA, MICROBIOLÓGICA E DE PERFIS DE
AMINOÁCIDOS E DE AMINAS BIOATIVAS LIVRES DO QUEIJO ARTESANAL
DA SERRA GERAL-MG**

Belo Horizonte

2021

Luciana Albuquerque Caldeira Rocha

**CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA, MICROBIOLÓGICA E DE PERFIS DE
AMINOÁCIDOS E DE AMINAS BIOATIVAS LIVRES DO QUEIJO ARTESANAL
DA SERRA GERAL-MG**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal da Escola de Veterinária da UFMG como requisito para obtenção do título de Doutor em Ciência Animal.

Área de Concentração: Tecnologia e Inspeção de Produtos de Origem Animal

Orientador: Maria Beatriz de Abreu Glória
Comitê de orientação: Marcelo Resende de Souza e Maximiliano Soares Pinto

Belo Horizonte

2021

R672c Rocha, Luciana Albuquerque Caldeira, 1982–
Caracterização físico-química, microbiológica e de perfis de aminoácidos e de amins bioativas livres do queijo artesanal da Serra Geral – MG/ Luciana Albuquerque Caldeira Rocha, - 2021.

148 f.il.

Orientadora: Maria Beatriz de Abreu Glória

Coorientadores: Marcelo Resende de Souza

Maximiliano Soares Pinto

Tese (Doutorado) apresentado à Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais.

Área de Concentração: Tecnologia e Inspeção de Produtos de Origem Animal.

Bibliografia f. 119 – 147.

Anexo: f. 148.

1. Queijo de Minas – Estudo - Teses - 2. Bactérias produtoras de ácido láctico – Teses -
3. Leite – Qualidade – Teses - I. Glória, Maria Beatriz de Abreu – II. Souza, Marcelo Resende de
- III. Pinto, Maximiliano Soares – IV. Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Veterinária
- V. Título.

CDD – 637

Bibliotecária responsável Cristiane Patrícia Gomes – CRB2569



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
ESCOLA DE VETERINÁRIA
COLEGIADO DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL**

FOLHA DE APROVAÇÃO

LUCIANA ALBUQUERQUE CALDEIRA ROCHA

Tese submetida à banca examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em CIÊNCIA ANIMAL, como requisito para obtenção do grau de DOUTOR em CIÊNCIA ANIMAL, área de concentração em Tecnologia e Inspeção de Produtos de Origem Animal.

Aprovada em 29 de março de 2021, pela banca constituída pelos membros:

Dr.(a). Maria Beatriz de Abreu Glória
Presidente – Orientador(a)

Dr.(a). Monica Maria Oliveira Pinho Cerqueira

Dr.(a). Maria José de Sena

Dr.(a). Christian Fernandes

Dr.(a). Sibelli Passini Barbosa Ferrão



Documento assinado eletronicamente por **Maria Beatriz de Abreu Gloria, Professora Magistério Superior - Voluntária**, em 29/03/2021, às 12:36, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Christian Fernandes, Professor do Magistério Superior**, em 29/03/2021, às 13:23, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Monica Maria Oliveira Pinho Cerqueira, Membro de comissão**, em 29/03/2021, às 14:57, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Maria Jose de Sena, Usuário Externo**, em 29/03/2021, às 17:29, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Sibelli Passini Barbosa Ferrão, Usuário Externo**, em 29/03/2021, às 22:55, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **0610974** e o código CRC **55257D9C**.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, de forma honrosa, por me permitir viver essa experiência.

A Vicente e aos meus filhos Davi e Daniel pelo amor imensurável, pela compreensão nos momentos ausentes, pelo apoio, pelas palavras de conforto. Vocês me fizeram forte, ajudando a superar os obstáculos, a distância, o tempo.

À professora Beatriz, pelos ensinamentos, pela confiança, pela atenção, pelo cuidado e pela amizade. Sinto-me orgulhosa e privilegiada pela orientação recebida. Você é um exemplo a ser seguido. Suas qualidades, vão além da sua competência, dedicação e coerência.

Ao professor Marcelo pelos incontáveis ensinamentos, estando presente na minha formação, desde a coorientação de monografia. Obrigada pela orientação oportuna, pela amizade, pela receptividade, pela disponibilidade, pelos conselhos. Tenho grande admiração pelo seu trabalho, que também me inspiram na “arte de ensinar”.

Aos queridos Cosme, Marco Antônio e Izabela pelo apoio na realização das análises.

Aos colegas Douglas, Gustavo, Ranier, Cecília, Guilherme, Marcela, Gabi, Manu e Carol, que me ajudaram em diferentes etapas da pesquisa, tornando tudo isso possível.

Ao professor Leorges por contribuir e disponibilizar o laboratório para realização das análises do leite.

Aos técnicos Diogo e Cida da Empresa de Assistência Técnica e Extensão Rural (Emater) e Marcos do Serviço de inspeção municipal da cidade de Porteirinha por toda colaboração durante a execução desse trabalho.

À prefeitura de Porteirinha e a Aciport, nas pessoas de Adão e Rosy.

Aos produtores de queijo artesanal da Serra Geral-MG e a Aproqueijo.

Aos Professores Joana, Cláudia e Maximiliano pelos direcionamentos na condução desse trabalho.

À Universidade Estadual de Montes Claros (Unimontes) pela oportunidade da capacitação profissional.

Aos colegas da Unimontes Flávio, Samy e Camila pelo auxílio nas análises de dados e aos demais colegas pelo apoio.

À FAPEMIG pela concessão da bolsa PCRH.

À FAPEMIG, CNPq, Laboratório de Bioquímica de Alimentos (LBqA) e Laboratório de Controle de Qualidade (LCQ) da Faculdade de Farmácia (UFMG) pelo apoio financeiro ao projeto.

À minha família pelo estímulo emocional.

A todo incentivo recebido, proporcionando a conquista desse marco na minha vida!

RESUMO

O conhecimento sobre a qualidade do queijo artesanal da Serra Geral-MG é escasso. Devido à sua relevância regional, objetivou-se com este estudo investigar as características físico-químicas e microbiológicas, bem como, a identificação de bactérias lácticas (BAL) no leite, pingo, queijo fresco e maturado por até 60 dias. A qualidade físico-química e microbiológica da água utilizada nas queijarias, a presença de microrganismos na superfície das bancadas de produção, a proteólise e os teores de aminoácidos livres e aminas bioativas também foram investigados. Foram selecionadas 12 queijarias, sendo seis cadastradas no Serviço de Inspeção Municipal (PSIM) e seis que não possuíam cadastro em órgão fiscalizador (NSIM). Os queijos PSIM apresentaram melhores características higiênico-sanitárias em relação ao NSIM. A segurança microbiológica foi alcançada com 21 dias de maturação para os queijos PSIM, entretanto, os queijos NSIM, não alcançaram os limites microbiológicos, ao longo dos 60 dias de maturação. Os queijos, a partir de 21 dias, foram classificados como gordos, com baixo teor de umidade, secos e de massa dura. Por outro lado, os queijos frescos foram enquadrados como gordos e de alta umidade, para ambos os grupos de produtores, contudo, apresentaram risco de consumo, associado à qualidade microbiológica deficiente. A água que abastece as queijarias e o leite cru utilizado como matéria-prima na produção dos queijos PSIM não apresentaram diferenças significativas, quando comparadas às propriedades NSIM. Porém, a qualidade microbiológica, encontrada para essas matrizes não foi satisfatória, indicando contaminação. As superfícies das bancadas das queijarias continham coliformes totais, *Staphylococcus* spp. e BAL, podendo servir de fonte de propagação de microrganismos durante a produção do queijo. O leite da Serra Geral-MG foi caracterizado com baixo teor de aminoácidos e aminas livres (principalmente histamina, putrescina e tiramina). Durante a maturação, houve aumento nos índices de proteólise, aminoácidos e aminas livres. Os teores de tiramina e histamina atingiram valores que podem causar efeitos adversos em indivíduos sensíveis. *Lactococcus lactis* foi a espécie das bactérias ácido-láticas mais frequente no queijo durante a etapa inicial da maturação. Essa pesquisa permitiu também conhecer a situação da Serra Geral-MG quanto a produção do queijo artesanal mineiro. A região é constituída por produtores em potencial, com expertises na elaboração de queijos que assemelham ao queijo Minas artesanal (QMA).

Palavras-chave: inspeção, leite, pingo, legislação, proteólise, tiramina.

ABSTRACT

Knowledge about the quality of artisanal cheese from Serra Geral-MG, Brazil, is scarce. Due to its regional relevance, the objective of this study was to investigate the physico-chemical and microbiological characteristics, as well as, the identification of lactic acid bacteria (LAB) in milk, whey-starter, fresh and aged cheese for up to 60 days. The physico-chemical and microbiological quality of the water used, the presence of microorganisms on the cheese making surfaces, the proteolysis and the contents of free amino acids and bioactive amines were also investigated. Twelve cheesemakers were selected, six registered under the Municipal Inspection Service (PSIM) and six with no registration (NSIM). PSIM cheeses had better hygienic-sanitary characteristics compared to NSIM. Microbiological safety was achieved at 21 days ripening for PSIM cheeses, whereas NSIM cheeses did not reach microbiological safety even with 60 aging. Cheeses, after 21 days aging, were classified as fat, with low moisture content, dry and hard. The fresh cheeses were classified as fat and of high moisture, for both groups of producers; however, they presented risk of consumption, associated with the deficient microbiological quality. The water supplied to the cheese factories and the raw milk used as raw material in the production of PSIM cheeses did not show significant differences when compared to the ones from NSIM properties. However, the microbiological quality found for these matrices was not satisfactory, indicating contamination. Cheese making surfaces contained total coliforms, *Staphylococcus* spp. and BAL, which can serve as a source of microorganisms propagation during cheese production. The milk from Serra Geral-MG was characterized by a low content of free amino acids and free amines (mainly histamine, putrescine and tyramine). During aging, there was an increase in proteolysis, and the contents of free amino acids and amines. The levels of tyramine and histamine reached levels which could cause adverse effects in sensitive individuals. *Lactococcus lactis* was the LAB most frequent in cheese during the initial stage of aging. Results were provided regarding the the production of artisanal cheese from Serra Geral, Minas Gerais. Potential producers have been identified, with expertise in making cheese that resembles artisanal Minas cheese. Cheese factories inspection was relevant to warrant microbiological safety of 21 days aged cheese.

Keywords: inspection, milk, endogenous culture, legislation, proteolysis, tyramine.

LISTA DE FIGURAS

Capítulo I

Figura I.1. Mapa do estado de Minas Gerais com destaque para as 13 regiões produtoras de queijos artesanais mineiros.....	17
Figura I.2. Via biossintética das poliaminas.....	27
Figura I.3. Biossíntese de amins biogênicas por bactérias.....	27
Figura I.4. Possíveis rotas de formação de amins bioativas em queijos.....	32

Capítulo II

Figura II.1. Fluxogramas de produção para elaboração dos queijos artesanais da Serra Geral-MG.....	39
Figura II.2. Contaminação microbiológica de leite e do pingo utilizado no processamento do queijo artesanal da Serra Geral.....	55
Figura II.3. Distribuição de frequência de bactérias ácido-láticas isoladas em diferentes matrizes pertencentes ao grupo de produtores que possuem o serviço de inspeção municipal (PSIM) e não possuem o serviço de inspeção municipal (NSIM).....	64

Capítulo III

Figura III.1. Resultados de análises de pH, acidez, gordura, cinzas, proteína, umidade, e sólidos totais dos queijos artesanais da Serra Geral-MG maturados durante 60 dias.....	78
Figura III.2. Comportamento e linha de tendência dos parâmetros microbiológicos (log UFC/g) dos queijos artesanais da Serra Geral-MG maturados durante 60 dias.....	83
Figura III.3. Distribuição de frequência de bactérias ácido-láticas isoladas do queijo fresco e maturado até 60 dias, pertencentes ao grupo de produtores que possuem o serviço de inspeção municipal (PSIM) e não possuem o serviço de inspeção municipal (NSIM).....	89
Figura III.4. Regressão linear para a extensão e profundidade da proteólise dos queijos artesanais da Serra Geral-MG maturados durante 60 dias.....	99
Figura III.5. (A) Projeção das características físico-químicas, microbiológicas, índices de proteólise, perfil de aminoácidos livres e amins bioativas dos dois grupos de produtores de queijo artesanal da Serra Geral-MG (PSIM e NSIM) durante 60 dias de maturação, obtida pela análise de componentes principais; (B) Dendograma obtido pelo método hierárquico, para os dois grupos de produtores de queijo artesanal da Serra Geral-MG (PSIM e NSIM) durante 60 dias de maturação; (C) <i>Loadings</i> de CP1; (D) <i>Loadings</i> de CP2.....	106

Capítulo IV

Figura IV.1. Características das unidades produtoras e do queijo artesanal da Serra Geral-MG.....	112
---	-----

LISTA DE TABELAS

Capítulo I

Tabela I.1. Características gerais e físico-químicas de queijos artesanais mineiros (QAM) produzidos em diferentes regiões.....	19
Tabela I.2. Padrão de qualidade para queijos Minas artesanais (QMA) e demais queijos segundo a legislação.....	20
Tabela I.3. Ocorrência de amins bioativas em queijos.....	33

Capítulo II

Tabela II.1. Valores médios, medianas e coeficiente de variação (CV) dos parâmetros físico-químicos e microbiológicos encontrados em amostras de água utilizada nas queijarias da região da Serra Geral-MG.....	47
Tabela II.2. Valores médios, medianas e coeficiente de variação (CV) da composição química, contagem padrão em placas (CPP) e contagem de células somáticas (CCS) do leite utilizado no processamento do queijo artesanal da Serra Geral-MG.....	50
Tabela II.3. Valores médios, coeficientes de variação (CV), valores mínimos e máximos da qualidade físico-química e microbiológica do pingo utilizado no processamento do queijo artesanal da Serra Geral-MG dos produtores pertencentes ao grupo PSIM.....	53
Tabela II.4. Medianas, coeficiente de variação (CV), valores mínimos e máximos da qualidade microbiológica das bancadas das queijarias artesanais da Serra Geral-MG.....	57
Tabela II.5. Valores médios, medianas, coeficiente de variação (CV), valores mínimos e máximos de parâmetros físico-químicos e microbiológicos do queijo artesanal fresco da Serra Geral-MG.....	60
Tabela II.6. Frequência de identificação de microrganismos em leite, pingo, bancada das queijarias e queijos artesanais frescos, pertencentes aos produtores que possuem o serviço de inspeção municipal (PSIM).....	65
Tabela II.7. Frequência de identificação de microrganismos em leite, pingo, bancada das queijarias e queijos artesanais frescos, pertencentes aos produtores que não possuem o serviço de inspeção municipal (NSIM).....	67

Capítulo III

Tabela III.1. Dados meteorológicos máximos, mínimos e médios da região da Serra Geral, Minas Gerais, Brasil, nos meses de julho, agosto e setembro de 2019.....	74
Tabela III.2. Valores médios, mínimos e máximos de parâmetros físico-químicos dos queijos artesanais da Serra Geral-MG ao longo da maturação.....	76
Tabela III.3. Valores medianos, mínimos e máximos de parâmetros microbiológicos dos queijos artesanais da Serra Geral-MG ao longo da maturação.....	82
Tabela III.4. Frequência absoluta da identificação de microrganismos em queijos artesanais frescos e maturados com 14, 21 e 60 dias pertencentes aos produtores que possuem o serviço de inspeção municipal (PSIM).....	93
Tabela III.5. Frequência absoluta de identificação de microrganismos em queijos artesanais frescos e maturados com 14, 21 e 60 dias pertencentes aos produtores que possuem o serviço de inspeção municipal (NSIM).....	94
Tabela III.6. Valores médios, medianas, coeficiente de variação (CV), valores mínimos e máximos dos aminoácidos livres e amins bioativas no leite utilizado como matéria prima para produção do queijo artesanal da Serra Geral-MG.....	96
Tabela III.7. Valores médios e desvio padrão da extensão e profundidade de proteólise para o queijo artesanal da Serra Geral-MG ao longo da maturação.....	98

Tabela III.8. Valores medianos, mínimos e máximos dos aminoácidos livres e íon amônio em queijos artesanais da Serra Geral-MG ao longo da maturação.....	100
Tabela III.9. Valores medianos, mínimos e máximos das aminas bioativas em queijos artesanais da Serra Geral-MG ao longo da maturação.....	103
Capítulo IV	
Tabela IV.1. Inadequações identificadas na produção artesanal do queijo da Serra Geral-MG.....	114

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO GERAL	13
OBJETIVOS	14
Objetivo geral.....	14
Objetivos específicos	14
CAPÍTULO I – REVISÃO DA LITERATURA	
1. Queijos artesanais de Minas Gerais	16
2. Queijo artesanal da Serra Geral-MG.....	21
3. Bactérias ácido-láticas e sua importância em queijos artesanais.....	23
4. Aminoácidos bioativos	26
4.1 Definição e formação.....	26
4.2 Propriedades benéficas e efeitos adversos à saúde	28
4.3 Aminoácidos bioativos em leite e queijo.....	30
CAPÍTULO II – PERFIL FÍSICO-QUÍMICO, MICROBIOLÓGICO E IDENTIFICAÇÃO PROTEÔMICA DE BACTÉRIAS ÁCIDO-LÁTICAS DO QUEIJO ARTESANAL FRESCO DA SERRA GERAL-MG	
1. INTRODUÇÃO.....	37
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	38
2.1 Amostragem.....	38
2.2 Análises laboratoriais	40
2.2.1 Análises físico-químicas e microbiológicas da água	40
2.2.2 Análises físico-químicas e microbiológicas do leite	40
2.2.3 Análises físico-químicas e microbiológicas do pingão.....	41
2.2.4 Análises físico-químicas e microbiológicas do queijo	41
2.2.5 Análises microbiológicas das bancadas da queijaria	41
2.3 Metodologias utilizadas nas análises microbiológicas	42
2.3.1 Enumeração de coliformes totais e <i>E. coli</i> no leite, pingão, bancadas das queijarias e queijo	42
2.3.2 Enumeração de <i>Staphylococcus</i> spp., <i>Staphylococcus</i> coagulase positivo no leite, pingão, bancadas das queijarias e queijo	42
2.3.3 Enumeração de bolores e leveduras no pingão e queijo	43
2.3.4 Enumeração de bactérias ácido-láticas no leite, pingão, bancadas das queijarias e queijo	43
2.3.5 Pesquisa de presença de <i>Salmonella</i> spp.....	43
2.3.6 Enumeração de coliformes totais e termotolerantes na água	44
2.3.7 Enumeração de mesófilos aeróbios na água	44
2.4 Identificação de bactérias ácido-láticas por MALDI ToF	44
2.5 Planejamento experimental e análise estatística	45
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	46
3.1 Qualidade físico-química e microbiológica da água utilizada nas queijarias artesanais da Serra Geral-MG	46
3.2 Qualidade físico-química, microbiológica e contagem de células somáticas do leite utilizado como matéria-prima para fabricação dos queijos artesanais da Serra Geral-MG.....	48
3.3 Qualidade físico-química e microbiológica do pingão.....	53
3.4 Qualidade microbiológica das bancadas das queijarias artesanais da Serra Geral-MG.....	56
3.5 Qualidade físico-química e microbiológica do queijo artesanal fresco da Serra Geral-MG.....	58
3.6 Identificação proteômica das bactérias ácido-láticas	63

4. CONCLUSÃO	67
CAPÍTULO III – CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS, MICROBIOLÓGICAS, NÍVEL DE PROTEÓLISE, PERFIL DE AMINOÁCIDOS E DE AMINAS BIOATIVAS LIVRES DO QUEIJO ARTESANAL DA SERRA GERAL-MG DURANTE A MATURAÇÃO	
1. INTRODUÇÃO	69
2. MATERIAL E MÉTODOS	70
2.1 Amostragem	70
2.2 Reagentes e soluções	71
2.3 Métodos de análises	71
2.3.1 Análises físico-químicas, microbiológicas e identificação de bactérias ácido-láticas do queijo	71
2.3.2 Índices de proteólise do queijo	72
2.3.3 Aminoácidos livres e aminas bioativas	72
2.4 Planejamento experimental e análise estatística	73
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	74
3.1 Características climáticas regional	74
3.2 Qualidade físico-química dos queijos ao longo de 60 dias de maturação	75
3.3 Qualidade microbiológica dos queijos ao longo de 60 dias de maturação	81
3.4 Identificação proteômica das bactérias ácido-láticas	88
3.5 Aminoácidos livres e aminas bioativas do leite utilizado como matéria-prima para elaboração dos queijos artesanais da Serra Geral-MG	95
3.6 Índice de proteólise dos queijos artesanais da Serra Geral-MG ao longo de 60 dias de maturação	97
3.7 Aminoácidos livres e aminas bioativas dos queijos artesanais da Serra Geral-MG ao longo de 60 dias de maturação	99
3.8 Análise multivariada aplicada aos dados dos queijos.....	105
4. CONCLUSÃO	108
CAPÍTULO IV - RECONHECIMENTO DA REGIÃO DA SERRA GERAL-MG COMO PRODUTORA DE QUEIJO ARTESANAL: TRADIÇÃO E DESAFIOS	
1. INTRODUÇÃO	109
2. MATERIAL E MÉTODOS	110
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	110
3.1 Instalações das queijarias	110
3.2 Processo produtivo	113
3.3 Comercialização	115
4. CONCLUSÃO	116
CONCLUSÕES INTEGRADAS	118
REFERÊNCIAS	119
ANEXO	148

INTRODUÇÃO GERAL

A região da Serra Geral, localizada no Norte de Minas Gerais, envolve 17 municípios que são caracterizados por um perfil de pequenos e médios produtores de leite, os quais destinam essa matéria-prima principalmente para a produção de queijo. Ainda, se destaca como tradicionalista nas condições produtoras desse derivado lácteo, buscando, no cenário atual, a consolidação e reconhecimento pelos órgãos competentes. A partir da publicação da Portaria 1825 de junho de 2018 (IMA, 2018), que considera a região como produtora de queijo artesanal, estratégias foram criadas no intuito de adequação do setor.

O queijo artesanal mineiro, amplamente conhecido em todo território nacional, é produzido a partir de leite cru e deve atender aos padrões estabelecidos pela legislação vigente (MINAS GERAIS, 2020). Devido à ausência do tratamento térmico na matéria prima, esse alimento pode veicular bactérias potencialmente patogênicas e/ou suas toxinas trazendo risco à saúde do consumidor, principalmente quando somado ao fato do consumo pela população, em alguns casos, ser do produto ainda fresco. Por consequência, a maturação é fundamental na elaboração de algumas variedades de queijos artesanais, por ocasionar uma série de alterações benéficas. Do ponto de vista sanitário, as mudanças acarretam a eliminação de microrganismos indesejáveis e contribuem para a predominância de uma microbiota desejável que age também estabelecendo características peculiares principalmente de sabor e textura nos queijos.

A identificação da microbiota envolvida, a caracterização das propriedades tecnológicas e o acompanhamento dos compostos formados durante a maturação dos vários tipos de queijos artesanais têm sido estudados em todo mundo. No entanto, em relação ao queijo oriundo da Serra Geral, não há conhecimento acerca destes assuntos. As pesquisas encontradas ainda estão em fases iniciais e precisam de complementações a partir de estudos mais amplos, relacionados à matéria prima leite, ao próprio queijo, à água utilizada nas queijarias, entre outros. Além disto, alguns metabólitos, tais como aminas biogênicas, podem ser produzidos por microrganismos (GLORIA et al., 2011), inclusive a partir da microbiota endógena presente nos queijos. As aminas biogênicas, pertencem a um grupo maior de compostos orgânicos, denominado aminas bioativas, que são formadas por processos bioquímicos e participam de funções metabólicas e fisiológicas importantes nos organismos vivos (LENIS et al., 2017). Apesar de serem necessárias em diferentes funções fisiológicas das bactérias, seres humanos e animais, um grupo de aminas, as biogênicas, em concentrações elevadas, podem causar diversos efeitos adversos à saúde humana (EFSA, 2011; BENKERROUM, 2016a).

Torna-se de fundamental importância avaliar a atividade metabólica das culturas lácticas envolvidas no queijo, visto que os processos de maturação podem favorecer a atividade enzimática proteolítica e propiciar a formação de amins biogênicas. Dessa forma, a etapa de maturação deve ser considerada, uma vez que contribui com características sensoriais desejáveis e uma possível diminuição de patógenos, mas, por outro lado, pode ocasionar a síntese das amins.

Muitos gêneros bacterianos são capazes de produzir enzimas descarboxiladoras de aminoácidos envolvidas na síntese das amins, sendo as bactérias ácido-láticas as principais produtoras (ÖZOGUL e HAMED, 2018). Além disso, os teores de amins bioativas em queijos têm sido pesquisados não só com o intuito de avaliar o potencial funcional e a toxicidade, mas também, devido às informações geradas em relação aos processos de deterioração, refletindo as condições higiênicas-sanitárias na obtenção e processamento dos produtos (GLORIA, 2005).

Nesse contexto, o conhecimento minucioso do queijo artesanal produzido na região da Serra Geral-MG contribuirá de forma significativa para melhorias no setor produtivo, e caracterização do produto, dando direcionamento para criação da identidade e qualidade, além de subsídios para regulamento específico a ser elaborado por órgão oficial competente.

OBJETIVOS

Objetivo geral

O objetivo geral deste trabalho foi investigar as características microbiológicas, físico-químicas e bioquímicas do queijo fresco e maturado durante 60 dias, produzido na região da Serra Geral-MG, comparando os resultados dos produtores que possuem o serviço de inspeção municipal em relação aos produtores sem inspeção.

Objetivos específicos

Os objetivos específicos deste trabalho foram:

- i. Determinar as características microbiológicas, físico-químicas, teores de aminoácidos e amins bioativas do leite utilizado como matéria prima para a produção do queijo artesanal produzido na região da Serra Geral-MG.

- ii. Determinar as características microbiológicas e físico-químicas da água utilizada nas queijarias.
- iii. Avaliar as condições higiênico-sanitárias das bancadas das queijarias por meio de suabes estéreis.
- iv. Determinar as características microbiológicas, físico-químicas, teores de aminoácidos e aminas bioativas ao longo de 60 dias de maturação do queijo artesanal produzido na região da Serra Geral-MG.
- v. Conhecer o perfil da microbiota ácido-lática do leite, pingo, bancada das queijarias e queijo, por meio de análise proteômica (MALDI ToF).
- vi. Comparar as características da água, do leite, contaminação das bancadas e queijo obtidos de produtores que possuem o serviço de inspeção municipal em relação aos que não possuem a inspeção.
- vii. Gerar informações que possam contribuir para criação do regulamento do queijo artesanal da Serra Geral-MG.

Para atender a cada um dos objetivos específicos, foram descritos e apresentados capítulos individuais, sendo o primeiro, um estado da arte na temática (Capítulo I), e os demais (Capítulos II, III e IV), artigos com ênfase no trabalho experimental e abordagem dos resultados obtidos.

CAPÍTULO I - REVISÃO DA LITERATURA

1. Queijos artesanais de Minas Gerais

A história da produção dos queijos artesanais no Brasil, remonta ao período colonial quando a pecuária foi introduzida no país pelos portugueses. Naquela época, o queijo era produzido como alternativa para conservação do leite e destinava-se a suprir a alimentação das famílias locais. Ao longo do tempo, as técnicas de processamento, herdadas dos europeus, foram adaptadas e repassadas para várias gerações (DUPIN, 2020). Atualmente, é produzida uma diversidade de queijos, cujas características, refletem fortemente a nossa formação cultural. Há produtos com características típicas e peculiares de cada região, mas também, versões adaptadas a partir de variedades oriundas de outros países. Segundo dados da Associação Brasileira das Indústrias de Queijo (ABIQ), o país atinge a quinta posição no cenário mundial, produzindo 1,2 milhões de toneladas de queijos por ano, sendo o produto absorvido no comércio interno, com consumo de 5,3 kg de queijo por habitante no ano e, exportação praticamente inexistente. O estado de Minas Gerais é o maior produtor de queijo do Brasil, dominando cerca de 25% da produção nacional (ABIQ, 2020).

Paralelo ao mercado de queijos industrializados, em ascensão, os queijos artesanais mineiros apresentam evolução relevante, com reconhecimento mundial a partir de premiações conquistadas em um dos principais concursos do setor, que acontece na França, o "*Mondial du Fromage et des Produits Laitiers*", enquanto internamente, no cenário brasileiro, os queijos também passam por adequações na cadeia, com regularização e ampliação de normas que definem o produto. Recentemente, foi publicado o Decreto 48.024 (MINAS GERAIS, 2020) que regulamenta a Lei 23.157 (MINAS GERAIS, 2018) para a produção e comercialização dos queijos artesanais produzidos em Minas Gerais. A nova lei possibilita que outras variedades de queijo possuam embasamento legal, já que normatizações antigas, incluindo as pertencentes ao âmbito Federal, apresentavam exigências concentradas apenas no queijo Minas artesanal (QMA).

Não existe uma única definição que caracterize um alimento artesanal. Diversos conceitos para queijos abrangem aspectos relacionados à utilização de leite cru ou pasteurizado, pequena escala de produção, utilização de técnicas manuais ou com a mínima introdução de equipamentos, uso de mão de obra familiar, além de formulações tradicionais (ROLDAN e REVILLION, 2019; SOUZA, 2019). Os queijos artesanais mineiros (QAM) são elaborados com leite cru e incluem os QMA, produzidos nas regiões de Araxá, Campo das Vertentes,

Canastra, Cerrado, Serra do Salitre, Serras da Ibitipoca, Serro e Triângulo Mineiro. Englobam também outras variedades, com formas de produção distintas do QMA, como: queijo tipo “parmesão” produzido na região da Mantiqueira, Vale do Suaçuí e município de Alagoa, queijo cabacinha da região do Vale do Jequitinhonha e queijo da Serra Geral no Norte do estado (Figura I.1).

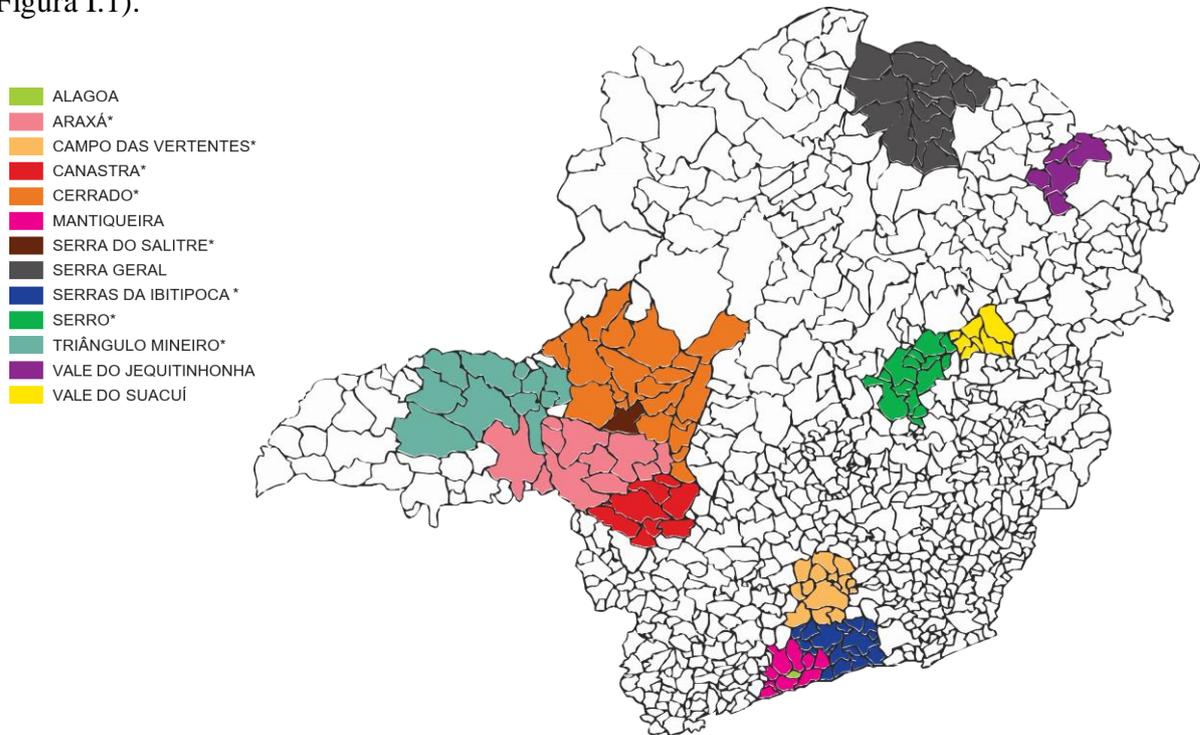


Figura I.1. Mapa do estado de Minas Gerais com destaque para as 13 regiões produtoras de queijos artesanais mineiros (QAM). *Queijo Minas artesanal.

Fonte: Adaptado de EMATER (2014), com atualização das regiões reconhecidas pelo estado

As etapas de produção básicas, que envolvem o QMA de todas as regiões, compreendem a filtração do leite, adição do pingo e coalho, coagulação, corte da coalhada, mexedura, dessoragem, enformagem, prensagem, salga seca e maturação (MINAS GERAIS, 2020). O queijo artesanal de Minas (QAM), especificamente os queijos tipo parmesão, produzidos na região de Alagoa, Serra da Mantiqueira e Vale do Suaçuí, são elaborados com leite cru e soro-fermento, no entanto, utilizam aquecimento da massa durante a produção, diferentemente do QMA (IMA, 2014; IMA, 2020a; IMA, 2020b;). Porém, na região do Vale do Jequitinhonha, o queijo artesanal típico é denominado de cabacinha, em função da semelhança com o formato de “cabaça”, utilizando uma etapa de filagem da massa, similar ao da muçarela, entretanto, sem haver a pasteurização da matéria-prima antes do processamento (SANTOS FILHO et al., 2020). Quanto ao queijo artesanal da Serra Geral, o cenário de produção atual envolve a utilização do leite cru, sem adição de fermento natural e comercializado fresco, porém, um número

significativo de produtores introduzem a etapa de adição do pingo, bem como iniciam técnicas de maturação, agregando valor ao alimento.

A composição do queijo e suas propriedades sensoriais, físico-químicas e microbiológicas refletem fortemente a qualidade da matéria-prima, a técnica de fabricação empregada, a condição ambiental que envolve o produto, além da microbiota presente na etapa de maturação. Em vários estudos é possível constatar a diversidade das características dos queijos artesanais, mesmo considerando queijos que apresentam uma tecnologia de fabricação semelhante e que são oriundos da mesma região (Tabela I.1). Segundo Kamimura et al. (2019), deve-se destacar a adição de pingo como um diferencial do processo produtivo do QMA. Pingo, fermento endógeno, soro-fermento e fermento láctico natural são termos utilizados para definir o líquido obtido após a salga do queijo, armazenado a temperatura ambiente e empregado no processamento do dia posterior. Sua biodiversidade é bastante variável, a depender da carga microbiológica do leite, o contato com o ambiente e até mesmo pela influência do processamento do queijo. Essa etapa do processo produtivo promove a inserção de uma microbiota complexa e diversificada ao produto, conferindo características físicas, químicas e sensoriais específicas, representativas da região na qual o produto é fabricado (NÓBREGA et al., 2008; PERIN et al., 2017a).

Outra etapa influente que diferencia as características dos queijos artesanais é a maturação. Durante essa etapa da produção, ocorre perda de umidade e, conseqüentemente, concentração dos componentes sólidos. O extrato seco total do queijo é representado pelos conteúdos de proteína, gordura, lactose e minerais, enquanto a umidade retrata principalmente o nível de sinerese durante o processamento, além da influência do tempo e ambiente de maturação ao qual o queijo é exposto. Ao longo da maturação, ocorre modificação das propriedades químicas e físicas da massa do queijo, alterando a textura e formando compostos responsáveis pelo desenvolvimento do *flavor* característico de cada variedade (MCSWEENEY, 2004).

Tabela I.1. Características gerais e físico-químicas de queijos artesanais mineiros (QAM), produzidos em diferentes regiões

Tipos de QAM e região	Características	Dias de maturação	pH	Propriedades físico-químicas (g/100 g)				Referências
				Umidade	EST	Proteína	Gordura	
QMA, Araxá	Geometria cilíndrica, coloração branco-marfim, casca e sabor suavemente ácido [3, 4]	ni	4,75	54,80	45,20	23,16	27,86	[1]
		Fresco*	4,92	56,64	43,46	18,71	27,67	[2]
		14*	5,05	35,21	64,79	24,67	36,83	[2]
QMA, Campo das Vertentes	Geometria cilíndrica, coloração amarelo-palha, casca semidura, podendo apresentar olhaduras e sabor suavemente ácido [3, 4]	Fresco*	5,53	49,35	50,65	19,86	29,17	[5]
		Fresco**	5,44	55,97	44,03	17,54	28,28	[5]
QMA, Canastra	Geometria cilíndrica, coloração amarela, textura granulosa e consistência semidura nos queijos maturados, sabor ácido e amanteigado [3, 4]	8	5,24	43,63	56,36	23,90	28,15	[6]
		60* ¹	-	38,80	61,20	22,30	27,50	[7]
QMA, Cerrado	Geometria cilíndrica, coloração amarela, consistência macia nos queijos mais frescos e semidura nos queijos maturados, sabor suavemente ácido [3, 4]	23	5,00	36,90	63,10	-	22,60	[8]
QMA, Serra do Salitre	Geometria cilíndrica, coloração branco-amarelada, consistência semidura e sabor suavemente ácido [4]	1**	5,18	53,10	46,84	18,96	23,69	[9]
		14**	4,96	35,32	64,62	30,60	33,68	[9]
QMA, Serro	Geometria cilíndrica, coloração branco-amarelada, casca lisa e sabor ligeiramente ácido [3, 4]	3	4,75	56,24	43,76	17,76	20,17	[10]
		17	5,17	51,04	48,96	20,65	22,92	[10]
Queijo Cabacinha, Vale do Jequitinhonha	Formato de “cabaça”, considerado versão brasileira do queijo “Caccio Cavallo”, de origem italiana. Produzido com massa filada, possui casca lisa e sabor suave [4, 11]	na	5,14	36,23	63,77	26,47	27,69	[12]

* período das águas; **período seco; ni = não informado; na = não se aplica; EST= extrato seco total; ¹média calculada dos 60 dias de maturação. [1] = Prata et al., 2020; [2] = Sales, 2015; [3] = Kamimura et al., 2019; [4] Araújo et al., 2020; [5] = Castro et al., 2016; [6] = Silva et al., 2011; [7] = Costa Júnior et al., 2009; [8] Oliveira et al., 2017; [9] = Figueiredo, 2018; [10] = Vale et al., 2018; [11] = Souza et al., 2020; [12] = Santos Filho et al., 2020.

O conhecimento das características físico-químicas e microbiológicas do queijo artesanal permite criar a identidade do produto, além de avaliar o atendimento a legislação vigente. Os padrões legais que regulamentam os queijos em geral e especificamente o QMA, incluem limites para o teor de umidade, contagens de coliformes totais, coliformes termotolerantes ou *Escherichia coli*, *Staphylococcus* coagulase positivo, *Salmonella* spp. e *Listeria* spp., conforme apresentado na tabela I.2. Os queijos também podem ser classificados quanto ao teor de gordura no extrato seco, com as seguintes categorias, extra gordo ou duplo creme: quando contém o mínimo de 60%; gordo: quando contém entre 45,0 e 59,9%; semi-gordo: quando contém entre 25,0 e 44,9%; magros: quando contém entre 10,0 e 24,9% e desnatados: quando contém menos de 10,0% (IMA, 2021a).

Tabela I.2. Padrão de qualidade para queijos Minas artesanais (QMA) e demais queijos segundo a legislação

Parâmetro	QMA	Queijo de baixa umidade	Queijo de média umidade	Queijo de alta umidade	Queijo muita alta umidade
Umidade (g/100 mL)	<45,9	<36,0	36,0 a 45,9	46,0 a 55,0	>55,0
Coliformes totais (UFC/mL)	5,00x 10 ³	1,00 x 10 ³	5,00 x 10 ³	1,00 x 10 ⁴	1,00 x 10 ³
Coliformes termotolerantes (UFC/mL)	5,00 x 10 ²	5,00 x 10 ²	5,00 x 10 ²	5,00 x 10 ³	1,00 x 10 ²
<i>Staphylococcus</i> coagulase positivo (UFC/mL)	1,00 x 10 ³	1,00 x 10 ³	1,00 x 10 ³	1,00 x 10 ³	1,00 x 10 ²
<i>Salmonella</i> spp. e <i>Listeria</i> spp.	Ausência em 25 g	Ausência em 25 g	Ausência em 25 g	Ausência em 25 g	Ausência em 25 g

* Portaria nº 2033 (IMA, 2021a).

A presença de microrganismos deteriorantes e patogênicos pode ser destacada como um dos principais obstáculos que envolvem a produção de queijos artesanais. A microbiota do leite pode diferenciar quando comparada ao queijo, principalmente em função da manipulação frequente durante o processamento do produto. *Brucella melitensis*, *Brucella abortus*, *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* spp. e *Staphylococcus aureus* são os possíveis patógenos do queijo produzido com leite cru (FOOD STANDARDS, 2009; JANSE et al., 2019; CONSTANZO et al., 2020). Segundo Yoon et al. (2016), deve-se considerar a possível presença de *Campylobacter* spp., *Coxiella burnetii*, *Mycobacterium bovis* e *Streptococcus* spp. Além desses microrganismos serem potencialmente causadores de doenças, são também responsáveis pela competição com a microbiota endógena dos queijos, diminuindo,

consequentemente, a atividade inibitória contra os microrganismos indesejáveis, realizados pelas bactérias benéficas.

2. Queijo artesanal da Serra Geral-MG

A atividade leiteira no Norte de Minas Gerais apresenta desempenhos produtivos inferiores, quando comparados a outras regiões do estado que lidera o *ranking* brasileiro, com produção média anual de 9,4 bilhões de litros de leite. Entretanto, tradicionalmente, o Norte de Minas Gerais demonstra-se importante na agropecuária estadual, onde, dentre as cidades que compõem essa mesorregião, o município de Porteirinha tem participação de 4,0% na produção total de leite de acordo com a Pesquisa de Pecuária Municipal. A produção é realizada principalmente por pequenas propriedades rurais, tradicionalistas, de pequeno e médio porte, com produção destinada principalmente à fabricação de queijos (MENEZES et al., 2014; IBGE, 2019).

A Serra do Espinhaço, denominada de Serra Geral em uma porção pertencente ao Norte de Minas Gerais, é composta por 17 municípios: Catuti, Espinosa, Gameleiras, Jaíba, Janaúba, Mamonas, Matias Cardoso, Mato Verde, Monte Azul, Montezuma, Nova Porteirinha, Pai Pedro, Porteirinha, Riacho dos Machados, Santo Antônio do Retiro, Serranópolis de Minas e Verdelândia. A região se insere em sua totalidade no clima Tropical Brasil Central, com temperatura média anual variando de 19,4 °C (mínima) a 33,9 °C (máxima), umidade relativa de 55,7% e índice pluviométrico acumulado de 514,6 mm, sendo as chuvas ocorrentes em poucos meses do ano e com longos períodos secos, estando a maior parte dos municípios alocados na zona de umidade semiárida (EMATER, 2018; IMA, 2018; INMET, 2019).

Historicamente, a região da Serra Geral-MG era consolidada pela atividade pecuária e algodoeira, entretanto, a partir da crise na produção do algodão na década de 90, a atividade leiteira, direcionada especificamente para a produção de queijos, se estabeleceu com estímulos do governo Federal. O incentivo promoveu a criação de fabriquetas e queijarias, provocando maior dinamismo na economia local. Considerando as limitações enfrentadas em função das exigências estabelecidas pela lei, como: custos dos investimentos em infraestrutura, qualidade da matéria-prima, sanidade animal, entre outros, muitos produtores mantiveram a atividade na condição clandestina. Atualmente a região se organiza, a partir da criação do consórcio de municípios, incluindo uma coordenadoria regional de inspeção sanitária e prestabilidade da inspeção municipal, já empregada em algumas cidades, enquanto alguns produtores, de forma pontual, pertencentes ao município de Porteirinha, cidade com maior representatividade

produtiva da região, de um total de 482 queijarias, conquistam a inspeção estadual (IMA), com produção de queijo com características do QMA. Entretanto, tradicionalmente a região é reconhecida por ofertar queijos produzidos com leite cru, fresco ou meia cura, de grande aceitação local, mas também com destinação de comércio no estado de São Paulo (EMATER, 2018; CNA, 2020).

O queijo artesanal da Serra Geral-MG tem características peculiares, apresenta coloração branca, peso médio de 860 g, 5 a 7 cm de altura e 14 a 15 cm de diâmetro (CARVALHO, 2018). O leite que serve de matéria-prima é obtido na propriedade em que ocorre a fabricação dos queijos, mas também, é adquirido por meio de compra de leite de terceiros. O processamento inicia-se com a filtragem do leite cru, seguido de coagulação durante um tempo médio de 50 minutos, e posterior corte da coalhada e mexedura. Após a obtenção dos grãos, parte do soro é retirado e a massa distribuída em formas plásticas redondas, armazenadas em bancadas para realização da salga a seco. Pode-se observar que não existe a utilização do pingo e após a etapa de coagulação, ocorre a adição de água quente para que a massa atinja uma temperatura de aproximadamente 40 °C. Além disso, a maturação não é realizada, sendo o produto comercializado fresco (EMATER, 2018). Saraiva (2019), caracterizando o sistema de produção do queijo artesanal da Serra Geral-MG por meio de visitas técnicas e aplicação de questionários em 28 propriedades, identificou seis diferentes tipos de fluxogramas produtivos, com variações relacionadas ao tipo de salga do queijo, ocorrendo a salga seca, salga na salmoura e no leite, além do emprego da etapa de toaleta (raspagens superficiais ao sair das formas) realizada em algumas propriedades. Foi constatado também que 7,14% dos produtores utilizavam pingo durante o processamento dos queijos, devendo-se considerar que essa é uma tendência mais recente.

Carvalho (2018) em pesquisa realizada na região da Serra Geral-MG, especificamente no município de Porteirinha, constatou deficiência da infraestrutura nos estabelecimentos de produção de leite e processamento de queijo, não se enquadrando nas exigências da legislação para produtos artesanais. Identificou também que o principal defeito dos queijos, relatados pelos produtores, era o estufamento precoce. Sendo assim, há imprescindibilidade de melhorias no setor, a partir do conhecimento e aplicação dos programas de boas práticas agropecuárias (BPA) e de boas práticas de fabricação (BPF), além de análises econômicas da empresa rural e na captação de recursos financeiros, objetivando um setor que atenda a legislação vigente, que seja produtivo e sustentável, garantindo ao consumidor um alimento de qualidade.

3. Bactérias ácido-láticas e sua importância em queijos artesanais

As bactérias ácido-láticas (BAL) são responsáveis pelo processo fermentativo do queijo e produzem o ácido lático como um dos principais metabólitos da fermentação de carboidratos. As BAL são microrganismos com características morfológicas, fisiológicas e metabólicas semelhantes, destacando-se com morfotipos em cocos ou bacilos, células simples, duplas ou tétrades podendo formar pequenas ou grandes cadeias. Ainda, são caracterizadas como Gram-positivas, não formadoras de esporos e catalase negativas. O fenômeno glicolítico também sugere uma classificação das BAL em homofermentativas ou heterofermentativas, com base no produto formado pela fermentação. As homofermentativas produzem ácido lático como principal produto da fermentação da glicose. Porém, as heterofermentativas, além de ácido lático, formam outras substâncias, como dióxido de carbono, ácido acético e etanol a partir da fermentação da glicose (CARR et al., 2002; ASTUTI, 2016; VINDEROLA, 2019). Em geral, as BAL encontram-se amplamente distribuídas na natureza, sendo isoladas de ambientes como solo, água, esgoto, esterco, silagem, trato intestinal e respiratório, boca, pele de animais e humanos, ocorrendo também em alimentos como frutas e outros produtos vegetais, além de carne e leite (KÖNIG Et al., 2017).

Atualmente, os principais gêneros pertencentes a este grupo são: *Aerococcus*, *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Fructobacillus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus* e *Weissella* (VINDEROLA, 2019). Segundo Jonnala et al. (2018), as BAL são indispensáveis para o desenvolvimento de características específicas dos queijos, conferindo ao produto sabor, aroma e textura desejáveis. Durante a maturação do queijo, a definição das propriedades sensoriais envolve as conversões dos componentes do leite, lactose, gordura e proteína, originando, respectivamente, os fenômenos glicolítico, lipolítico e proteolítico. As culturas microbianas presentes são as principais fontes das enzimas envolvidas nessas vias (SMIT et al., 2005), podendo também contribuir para a redução do período de maturação em queijos. Esses microrganismos liberam aminopeptidases que favorecem a proteólise e, conseqüentemente, a formação de *flavours* desejáveis (MORGAN et al., 2002; CAMPAGNOLLO et al., 2018).

Várias pesquisas têm sido desenvolvidas, por meio da técnica molecular de amplificação e sequenciamento do gene 16S rRNA, com o objetivo de identificar a comunidade bacteriana presente nos queijos. Kamimura et al. (2019), avaliando BAL em 578 amostras de queijos artesanais brasileiros (Norte: queijo Marajó; Nordeste: Coalho e Manteiga; Centro-oeste; queijo Caipira; Sudeste: QMA de Araxá, Campo das Vertentes, Canastra, Cerrado e Serro; Sul: queijo

Colonial e Serrano), constataram a predominância dos gêneros *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc* e *Streptococcus*. Silva (2016) encontrou frequência elevada de bactérias do gênero *Lactobacillus*, dentre as BAL isoladas de queijo Minas artesanal da região de Araxá maturado por até 60 dias. Martins et al. (2018) avaliando a diversidade de microrganismos nos queijos artesanais produzidos nos municípios de Redenção e Conceição do Araguaia - PA, identificaram as seguintes espécies: *Weissella paramesenteroides*, *Lactococcus* spp. (*L. lactis* e *L. garvieae*), *Enterococcus* spp., *Leuconostoc mesenteroides*, *Streptococcus infantarius*, *Pediococcus acidilacti* e *Lactobacillus plantarum*. Domingos-Lopes et al. (2017) encontraram os seguintes gêneros: *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus* e *Leuconostoc* em queijo artesanal Pico, produzido em Portugal, no entanto, o gênero *Enterococcus* foi predominante durante a maturação de 21 dias. Ballesteros et al. (2006) identificando BAL no queijo espanhol Manchego, por meio de provas bioquímicas, constataram predominância de bactérias do gênero *Lactobacillus*, com frequência de 30%.

Segundo Sant`Anna et al. (2019), a comunidade bacteriana do queijo artesanal é influenciada pelas comunidades bacterianas presentes no leite e no pingo. Os autores, avaliando o QMA da região da Serra do Salitre, identificaram uma possível adaptação ambiental dessas bactérias no queijo, constatando, via sequenciamento de alto rendimento com alvo específico para o gene 16S rRNA, a prevalência de *Streptococcus* nos queijos ao longo do período de 60 dias de maturação, enquanto *Lactobacillus* e *Leuconostoc* apareceram apenas em estágios tardios da maturação.

Além das alterações nas características sensoriais, determinadas BAL promovem a conservação dos queijos inibindo a microbiota deteriorante e patogênica. Esta atividade antagonica pode ser justificada pela competição dos microrganismos por nutrientes, além das mudanças que vão ocorrendo no queijo durante a maturação, como: diminuição do potencial redutor, formação de ácidos orgânicos, redução do pH e produção de compostos inibidores (peróxido de hidrogênio, dióxido de carbono, diacetil) (POPPI, 2005; ÖZOGUL e HAMED, 2018). Cabral et al. (2016) estudando as propriedades tecnológicas das BAL isoladas do queijo coalho artesanal produzido na região agreste do estado de Pernambuco, observaram que 90% das bactérias testadas exibiram atividade antagonista frente ao crescimento dos patógenos *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* e *Staphylococcus aureus*. Costa et al. (2018) comprovaram o efeito antagonico de BAL no queijo fresco. Foi observado que *Lactobacillus plantarum* 49 e *Lactobacillus paracasei* 108 favoreceram a diminuição da contagem de *Listeria monocytogenes*, enquanto *Lactobacillus plantarum* 201 exerceu efeito bacteriostático contra o mesmo patógeno durante 14 dias de armazenamento refrigerado.

A atividade antagônica das BAL pode também ser associada à habilidade desses microrganismos em produzir substâncias proteicas com atividade antibacteriana como as bacteriocinas. Estas são proteínas de baixo peso molecular que se ligam aos receptores na superfície da célula alvo provocando ruptura na membrana e degradação do DNA celular (TODOROV, 2019). Atualmente, nisina e pediocina PA-1, produzidas por *Lactococcus lactis* e *Pediococcus acidilactici*, respectivamente, são as bacteriocinas mais empregadas para fins de conservação dos alimentos (HEREDIA-CASTRO et al., 2017). Heredia-Castro et al. (2015), avaliando *Lactobacillus* spp. isolado do queijo mexicano *cocido* artesanal constataram síntese de bacteriocina, que atuou contra bactérias gram-positivas e gram-negativas.

Vários são os benefícios associadas às BAL. Biscola et al. (2018) atribuíram a algumas espécies desse grupo de microrganismos, a capacidade de hidrolisar proteínas lácteas, originando produtos hipoalergênicos. Dentre as espécies isoladas do queijo artesanal brasileiro, *Enterococcus faecalis* apresentou atividade proteolítica satisfatória, hidrolisando parcialmente α -S1-caseína, α -S2-caseína, β -caseínas, α -lactalbumina e β -lactoglobulina. Por outro lado, *Pediococcus acidilactici* e *Weissella viridescens* provocaram hidrólise parcial na α -S1-caseína e α -S2-caseína. Ainda, segundo Santiago-López et al. (2018), o queijo pode ser fonte de diversos compostos bioativos, formados pelas BAL durante a maturação, como: ácido γ -aminobutírico (GABA) e ácido linoleico conjugado (CLA), metabólitos com propriedades antioxidantes e imunológicas, sendo associados a efeitos benéficos para o ser humano. Ares-Yebra et al. (2019) sugerem a utilização de *Lactobacillus plantarum* L200 como cultura adjunta para aumentar as concentrações de CLA em queijos maturados. Como resultado da lipólise, pode ocorrer a liberação de ácido linoleico e consequente formação de seus isômeros, incluindo o CLA, a partir de enzimas microbianas.

O crescente interesse em queijos artesanais deve-se, em parte, às características sensoriais do produto que são oriundas da ação das BAL (SCHIRONE et al., 2013). Entretanto, a utilização desses microrganismos com o objetivo de impedir a formação de amins biogênicas também tem sido estudada. A ação inibitória depende das espécies selecionadas, já que também podem causar efeito sinérgico aumentando a formação de amins biogênicas (ÖZOGUL e HAMED, 2018). Tittarelli et al. (2019) identificaram em queijo italiano, produzido com leite cru de ovelha, 24 linhagens bacterianas com habilidade de degradação de amins biogênicas, destacando *Lactobacillus casei* e *Enterococcus casseliflavus* com capacidade de reduzir os teores de histamina e tiramina. Renes et al. (2019), avaliando a ação de bactérias lácticas sobre as amins bioativas em queijo com leite de ovelha pasteurizado, constataram que a utilização

de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* e *Lactobalillus plantarum* reduziu a concentração de aminas biogênicas.

4. Aminas bioativas

4.1 Definição e formação

As aminas bioativas ou biologicamente ativas são bases orgânicas alifáticas, alicíclicas ou heterocíclicas de baixa massa molecular. Esses compostos são produzidos e degradados de acordo com as atividades metabólicas normais em humanos, animais, vegetais e microrganismos (BARONE et al., 2018). As aminas bioativas podem ser classificadas de diferentes formas, entretanto, a classificação mais usual e utilizada na abordagem do presente trabalho, está relacionada à função que exercem, sendo definidas em poliaminas e aminas biogênicas. As poliaminas, representadas por espermidina e espermina, possuem atividade moduladora e promotora do crescimento celular, síntese de DNA, RNA e proteínas, além de serem antioxidantes. As aminas biogênicas, incluindo tiramina, putrescina, cadaverina, histamina, serotonina, triptamina, agmatina e feniletilamina, são neuroativas e vasoativas, devido aos seus efeitos nos sistemas neural e vascular, respectivamente (MAYER et al., 2010; SANTIAGO-SILVA et al., 2011; THORNTON e OSBORNE, 2012; BENKERROUM, 2016a; LENIS et al., 2017).

A biossíntese das poliaminas acontece via ornitina ou arginina, realizadas pela ação das enzimas ornitina descarboxilase e arginina descarboxilase, respectivamente, tendo como intermediário obrigatório a putrescina, em ambas rotas (Figura I.2). Em sequência, um grupo aminopropil, derivado da metionina é adicionado à putrescina, promovendo a síntese da espermidina e com a junção de outro aminopropil à espermidina, ocorre a formação de espermina. Em vegetais, a ocorrência dessas poliaminas deriva das duas formas, enquanto as bactérias utilizam a rota com formação da agmatina e os animais e fungos por meio da descaboxilação da ornitina (GLORIA, 2005; LENIS et al., 2017).

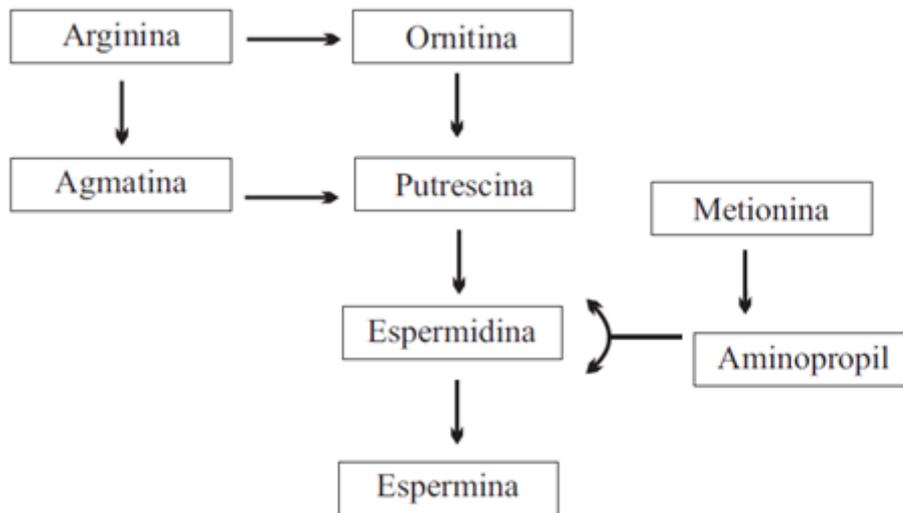


Figura I.2. Via biossintética das poliaminas.
Fonte: Adaptado de Glória (2005)

As aminas biogênicas são formadas por reações de descarboxilação de aminoácidos, conduzidas por descarboxilases endógenas, presentes naturalmente nos alimentos ou oriundas da microbiota existente e adicionada. Os microrganismos com atividade aminoácidos-decarboxilase liberam enzimas, como estratégia de sobrevivência em resposta às condições adversas do meio, no qual estão inseridos. Em pH 2,5 a 6,5, a produção de aminas pelas bactérias é estimulada como uma proteção contra o ambiente ácido. Nessa situação, ocorre o consumo de prótons com liberação de CO_2 e a síntese de amina com a finalidade de reequilibrar o pH (Figura I.3), propiciando a permanência da célula nesse ambiente (BOVER-CID, 2000; COTTER e HILL, 2003).

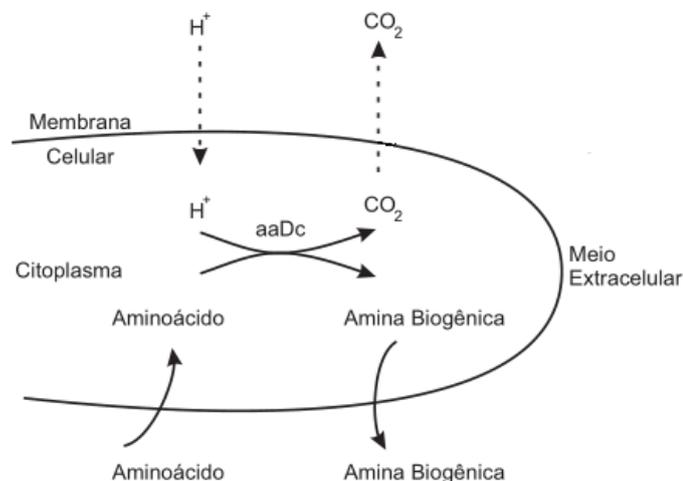


Figura I.3. Biossintese de aminas biogênicas por bactérias.
Fonte: Adaptado de Bover-Cid (2000)

Segundo Pagthinathan e Nafees (2015), a descarboxilação do aminoácido pode contribuir para a elevação de pH do queijo durante a maturação, além de formação de aminas como cadaverina e putrescina, que contribuem com forte odor putrefativo, afetando negativamente a qualidade de queijo. Essa ocorrência é dependente da disponibilidade do aminoácido precursor, da microbiota, do tempo e temperatura de maturação, além da concentração de sal no queijo.

4.2 Propriedades benéficas e efeitos adversos à saúde

As aminas bioativas, em baixas concentrações são relevantes para a manutenção da saúde. Em indivíduos saudáveis, as aminas quando ingeridas, são absorvidas e metabolizadas no organismo por conjugação ou mediante reações de oxidação por ação de enzimas monoaminoxidase (MAO), diaminoxidase (DAO) e poliaminoxidase (PAO) (DOEUM et al., 2017; TITTARELLI et al., 2019).

As poliaminas são componentes indispensáveis em todas as células vivas, estando envolvidas no crescimento, diferenciação, síntese de DNA, RNA, proteínas e estabilização de membranas celulares (WALLACE et al., 2003; BANDEIRA et al., 2012; MATSUMOTO, 2015). Diversos efeitos associados às poliaminas, envolvem o tecido intestinal. Segundo Loser et al. (2000), esse fato está relacionado a ação da espermina e espermidina sobre o desenvolvimento do sistema digestivo, frente a alta taxa de proliferação das células, desempenhando funções como renovação do lúmen, permeabilidade da mucosa, renovação e maturação do tecido intestinal do recém-nascido (MATSUMOTO e KURIHARA, 2011). As poliaminas também possuem a capacidade de atuar como antioxidantes em sistemas biológicos, principalmente em seus constituintes da membrana. Os principais mecanismos de ação são a eliminação de radicais livres e a quelação de metais, que previne a formação de hidroperóxidos, retardando o desenvolvimento de compostos de oxidação. Ainda, estão envolvidas em vários fenômenos fisiológicos em resposta ao estresse e retardamento da senescência (TORO-FUNES et al., 2013; HANDA et al., 2018; MUÑOZ-ESPARZA et al., 2019).

Por outro lado, em concentrações elevadas, algumas aminas podem provocar efeitos adversos à saúde (EFSA, 2011). Isso ocorre em situações como: deficiência genética, agentes farmacológicos inibidores das enzimas metabolizadoras, substâncias potencializadoras como a presença das próprias aminas (cadaverina, espermidina, feniletilamina, putrescina, triptamina, tiramina) que podem aumentar o efeito nocivo de algumas aminas (DOEUM et al., 2017; TITTARELLI et al., 2019).

A intoxicação mais relatada na literatura, associada às aminas biogênicas, é a histamínica, também chamada de intoxicação por escombróide, pela associação com peixes da família Scombridae como, atum, bonito, cavala, dentre outros. Entretanto, queijo e vinho também são importantes veiculadores. Os sintomas incluem: enxaquecas, urticária, náuseas, vômitos, diarreia, arritmia e dificuldade respiratória (GLORIA, 2005; RUIZ-CAPILLAS e HERRERO, 2019). Segundo Durak-Dados et al. (2020), a toxicidade da histamina se torna mais potente quando está concomitantemente presente no alimento a putrescina e a cadaverina, que provocam um efeito sinérgico por meio da inibição das enzimas oxidantes da histamina.

A tiramina é a amina mais comumente encontrada em queijos e está associada a manifestação de uma síndrome conhecida como “reação do queijo”. Esta é causada pela intoxicação em função do consumo em níveis elevados dessa amina, sendo capaz de provocar crise hipertensiva, excitação, palpitação cardíaca, dor de cabeça, edema pulmonar, alterações na visão, náusea, salivação, vômito, contração muscular, febre e transpiração (SHALABY, 1996; GLORIA, 2005). O mecanismo de ação da tiramina está relacionado com a liberação de norepinefrina, epinefrina e dopamina das vesículas de armazenamento pré-sinápticas. Esses neurotransmissores, particularmente a norepinefrina, são responsáveis pela vasoconstrição, aumento da frequência cardíaca e aumento da pressão arterial (BURNS e KIDRON, 2020).

Sintomas de dores de cabeça e crises de enxaqueca, podem também ser provocados por outras aminas como, feniletilamina e triptamina (GLORIA, 2005; BARONE, 2017). Putrescina e cadaverina não são comumente causadores de efeitos diretos, nocivos à saúde humana, mas podem potencializar o efeito tóxico de outras aminas (DURAK-DADOS et al., 2020) com capacidade de reagirem com nitritos e formarem N-nitrosaminas cancerígenas (KOUTSOUMANIS et al., 2010), além de serem utilizadas como parâmetros de deterioração (BENKERROUM, 2016a).

De acordo com o relatório publicado pela *European Food Safety Authority*-EFSA (EFSA, 2011), não há uma definição da quantidade segura de aminas bioativas em alimentos, pois a dose tóxica, depende da eficiência dos mecanismos de detoxificação individual. Em indivíduos normais, o nível sem efeitos adversos observados (*no observed adverse effect level* – NOAEL), por refeição, é de 50 mg de histamina, enquanto para tiramina, por refeição, é indicado valores de 600 mg. Porém, esses limites podem ser inferiores para pessoas sensíveis, que fazem uso de medicamentos inibidores de monoaminoxidase (IMAO) de terceira geração e clássico, com limiar de 50 mg e 6 mg de tiramina, respectivamente. Quanto à histamina, não existe estudo conclusivo, que defina a quantidade limite. Dessa forma, indivíduos com restrições devem se limitar ao nível abaixo do detectável, para essa substância.

No Brasil e no mundo, não há exigência legal para queijos regulamentando teores de aminas biogênicas. A legislação existente é apenas para histamina em peixes frescos, congelados e em conservas, das famílias Carangidae, Gempylidae, Istiophoridae, Scombridae, Scombresocidae, Engraulidae, Clupeidae, Coryphaenidae e Pomatomidae com limite máximo de 100 mg/kg para a média de nove unidades amostrais e 200 mg/kg para amostra individual na legislação brasileira (BRASIL, 1997; BRASIL, 2011; BRASIL, 2017).

4.3 Aminas bioativas em leite e queijo

O leite bovino, geralmente apresenta baixos teores de aminas bioativas, sendo as mais abundantes as poliaminas, espermina e espermidina (COSTA et al., 2018). Entretanto, a presença e a concentração das aminas nesse alimento estão vinculadas a diversos fatores. Löser (2000) relatou como sendo as principais aminas do leite bovino, a espermina, espermidina e putrescina. Afirmou que esse perfil é influenciado pela idade do animal, espécie, período de lactação, dieta, fatores genéticos, fatores ambientais e microbiota presente. Estudo realizado por Gloria et al. (2010) para avaliação dos teores de aminas em leite cru de vacas oriundas de um mesmo rebanho, indicou predominância de espermina (35,1%), putrescina (17,6%), serotonina (15,8%), espermidina (15,8%) e feniletilamina (14,1%).

Segundo Giorgio et al. (2018) o colostro e o leite de cabra são ricos em poliaminas e a concentração total é superior à observada em leite de outros mamíferos. Comparando o leite da espécie caprina com a ovina, Galitsopoulou et al. (2015) constataram no leite caprino maior concentração de espermina, espermidina e putrescina na fase colostrar e na fase de transição da lactação. Além disso, foi observado um aumento significativo dessas aminas no terceiro dia após o parto, registrado para ambos os tipos de leite. Segundo os autores, esse fenômeno indica um possível aumento na atividade metabólica e síntese de proteínas na glândula mamária.

Considerando que a mastite pode afetar a qualidade do leite e aumentar a proteólise, Ubaldo et al. (2015) avaliaram a influência da contagem de células somáticas (CCS) (baixa CCS = $2,04 \times 10^5$ células/mL; média CCS = $6,02 \times 10^5$ células/mL; alta CCS = $2,29 \times 10^6$ células/mL) sobre as aminas bioativas no leite cru e não constataram a presença de teores quantificáveis de aminas livres ($\geq 0,5$ mg/L). Entretanto, quando essa matéria-prima foi empregada na elaboração do queijo muçarela, a poliamina espermina e as aminas biogênicas tiramina e triptamina foram detectadas, dentre as dez aminas investigadas. Espermina foi encontrada em queijos de todas as categorias (baixa, média e alta CCS), enquanto tiramina e triptamina só foram detectadas em queijos produzidos com leite contendo elevadas CCS,

sugerindo que a presença dessas aminas biogênicas no queijo pode ser utilizada como indicativo de qualidade do leite, associado à mastite.

Yılmaz et al. (2020), investigando os teores de histamina em leite pasteurizado, leite UAT e queijo maturado, constataram baixa concentração da amina na matéria-prima, quando comparada ao produto derivado. Aminoácidos livres são encontrados no leite, mas também podem ser liberados como resultado da atividade proteolítica no queijo durante a maturação, propiciando a formação de aminas bioativas. A influência da proteólise na formação de aminas bioativas pode ser observada em queijos que foram produzidos com um curto tempo de maturação, quando comparados com queijos de maturação acima de 60 dias. Em alguns queijos de maturação prolongada, a concentração de aminas biogênicas aumenta de 10 a 2000 vezes (INNOCENTE e D'AGOSTIN, 2002; PERRY, 2004).

A formação e o acúmulo de aminas biogênicas em queijos requerem a disponibilidade de aminoácidos livres, a presença de bactérias com atividade descarboxilase, além de condições ambientais que permitam o crescimento bacteriano e a atividade enzimática (Figura I.4). Em relação às características intrínsecas do queijo, destaca-se que o pH é importante tanto para modular a microbiota envolvida na síntese de aminas, quanto para influenciar a atividade da enzima descarboxiladora do aminoácido. Uma faixa de pH de 4,0 a 5,5 é a ideal para que ocorra ação da descarboxilase. Ainda, o teor de sal encontrado no queijo pode controlar a produção de aminas bioativas pelo efeito inibitório na taxa de crescimento de bactérias envolvidas na síntese desses compostos (GLORIA, 2005; CHONG et al., 2011).

Na tabela I.3 é possível observar as aminas bioativas mais comuns em queijos e suas concentrações. Estudo realizado por Moreira et al. (2018) avaliando o queijo tipo Gorgonzola, constatou que a tiramina foi a amina prevalente, atingindo 33,3 mg/100 g quando maturado por 49 dias. Tiramina também foi a amina predominante em queijos Raclette, Gruyère e queijos artesanais elaborados com leites de cabra e de ovelha (ONER et al., 2006; SANTOS et al., 2017; ESPINOSA-PESQUEIRA et al., 2018). Zazzu et al. (2019) observaram que no queijo Fiore Sardo, produzido com leite de ovelha, foram encontradas maiores concentrações de tiramina, seguido de putrescina, histamina e cadaverina (médias de 35, 15, 8 e 3 mg/100 g, respectivamente). Entretanto, Podeva et al. (2015), avaliando aminas biogênicas em queijo Manchego elaborado com leite de cabra, detectaram como amina predominante, a cadaverina. Araújo (2013) observou que a histamina foi a amina encontrada em maior concentração no QMA da região do Serro-MG. Essa variação, encontrada nas diferentes pesquisas, pode ser justificada pelas particularidades no processo produtivo e pela qualidade do leite utilizado como matéria-prima.

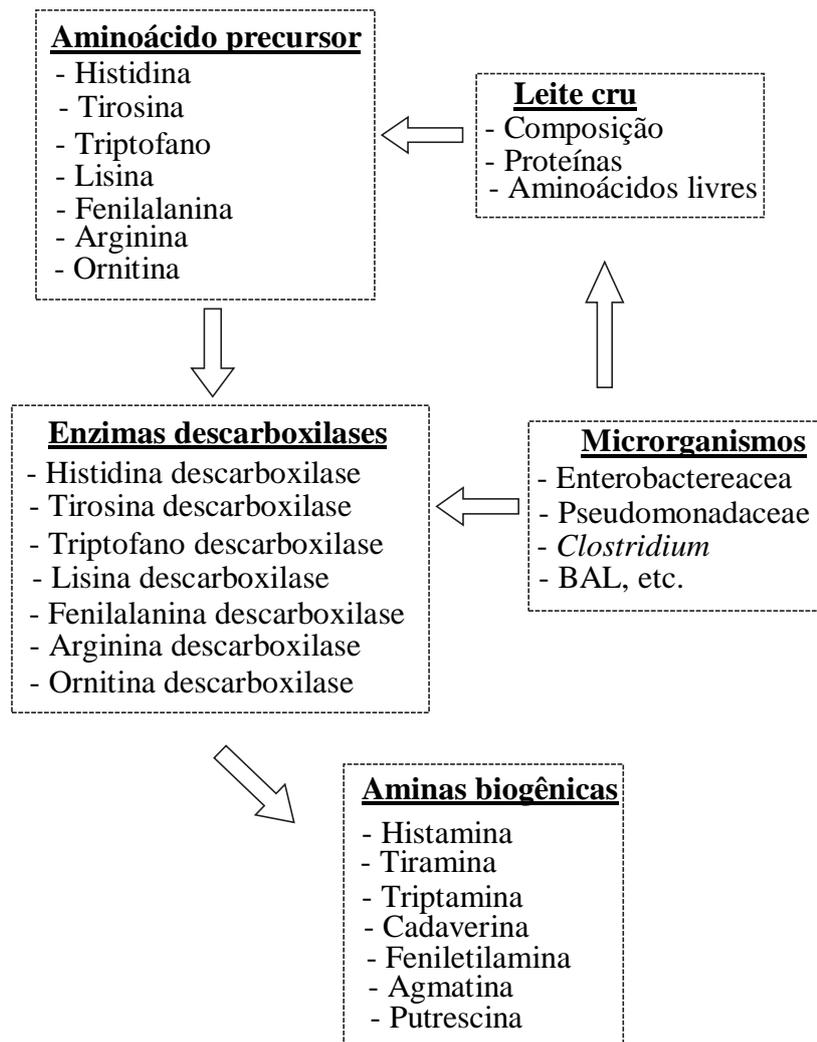


Figura I.4. Possíveis rotas de formação de aminas bioativas em queijos.
Fonte: Adaptado de Ruiz-Capillas e Herrero (2019)

Milewski et al. (2018), avaliando o queijo artesanal elaborado com leite de cabra, com 30 dias de maturação sob condições climáticas da região de Warmia e Mazury na Polônia, encontraram concentrações de aminas biogênicas totais quase duas vezes superior em queijo produzido na época do inverno quando comparado ao verão (105,64 e 56,76 mg/100 g respectivamente). Considerando a influência da dieta animal na composição do leite, foi observado que durante o inverno o leite utilizado para produção dos queijos apresentou maior teor de proteína, sugerindo maior disponibilidade de aminoácidos e acúmulo de aminas biogênicas. Entre as aminas biogênicas, o conteúdo da cadaverina foi maior no queijo produzido durante o inverno, enquanto putrescina foi a predominante no período de verão.

Tabela I.3. Ocorrência de aminas bioativas em queijos

Tipos de queijos	Características da matéria-prima	Tempo de maturação (dias)	Aminas bioativas (mg/100 g)										Referências
			AGM	CAD	HIM	FEM	PUT	EPD	EPM	SRT	TRM	TIM	
Tipo Gorgonzola	Leite de vaca, pasteurizado	49	3,4	nd	2,4	4,1	nd	nd	nd	3,6	3,3	33,3	Moreira et al., 2018
Tipo Raclette	Leite de vaca, pasteurizado	90	na	0,30	na	na	7,00	nd	nd	na	na	32,88	
Tipo Gruyere	Leite de vaca, pasteurizado	90	na	0,53	na	na	1,52	0,67	nd	na	na	24,56	Santos et al., 2018
Minas Padrão	Leite de vaca, pasteurizado	25	na	0,47	na	na	0,97	nd	nd	na	na	9,25	
Prato	Leite de vaca, pasteurizado	30	na	24,19	na	na	20,04	0,10	nd	na	na	24,66	
Turkish White	Leite de vaca, cru	105	na	na	0,12	nd	na	na	na	na	nd	1,05	Oner et al., 2006
QMA do Serro	Leite de vaca, cru	60	na	0,33	42,28	1,66	15,10	<0,04	nd	na	0,83	6,85	Araújo, 2013
Artesanal espanhol	Leite de cabra, cru	5	na	3,20	0,12	0,14	0,40	0,11	0,22	na	0,89	0,43	Espinosa-Pesqueira et al., 2018
	Leite de cabra, cru	60	na	7,04	1,54	3,11	47,64	0,39	0,39	na	6,36	49,19	
Manchego	Leite de ovelha, pasteurizado	60	na	0,58	3,38	nd	nd	na	na	na	nd	0,84	Poveda et al., 2015
	Leite de ovelha, pasteurizado	240	na	0,45	3,38	nd	nd	na	na	na	nd	5,40	
Fiore Sardo	Leite de ovelha, cru	105	na	3,00	8,00	1,00	15,00	na	5,00	na	0,30	35,00	Zazzu et al., 2019
Artesanal espanhol	Leite de ovelha, cru	5	na	6,21	0,48	0,10	0,36	0,73	0,67	na	0,16	0,43	Espinosa-Pesqueira et al., 2018

Tabela I.3. Continua

Tipos de queijos	Características da matéria-prima	Tempo de maturação (dias)	Aminas bioativas (mg/100 g)										Referências
			AGM	CAD	HIM	FEM	PUT	EPD	EPM	SRT	TRM	TIM	
Artesanal espanhol	Leite de ovelha, cru	60	nd	10,59	9,10	1,27	7,48	3,01	1,46	nd	1,57	27,73	Espinosa-Pesqueira et al., 2018

AGM = agmatina; CAD = cadaverina; HIM = histamina; FEM = feniletilamina; PUT = putrescina; SPD = espermidina; SPM = espermina; SRT = serotonina; TRM = triptamina; TIM = tiramina; na = não avaliado; nd = não detectado.

Em queijos artesanais, o perfil de aminas bioativas irá variar principalmente em função da microbiota autóctone, geralmente apresentada com uma grande diversidade. Grande parte dos queijos artesanais é produzida sem tratamento térmico. Dessa forma, maior quantidade de microrganismos pode estar presente e com probabilidade de formação de aminas biogênicas. Combarros-Fuertes et al. (2015) constataram que queijos elaborados com leite cru, apresentam concentração de aminas biogênicas duas vezes maior em relação aos elaborados com leite pasteurizado. Ladero et al. (2008) apontaram que o queijo fabricado com leite pasteurizado pode apresentar menores teores de aminas biogênicas, pela inativação em função do calor utilizado no tratamento térmico e do piridoxal fosfato, que é cofator para atividade das descarboxilases.

Espermina e espermidina poucas vezes foram detectadas em queijos e quando é possível definir seus valores, as concentrações são baixas (MOREIRA et al., 2017; SANTOS et al., 2018). A presença das poliaminas em mínimas concentrações, é esperada, pois estas podem atuar como fator de crescimento para os próprios microrganismos presentes no alimento.

Vários estudos demonstram a associação de bactérias específicas na formação de aminas bioativas em queijos, pois a produção de enzimas do tipo descarboxilases não é uma característica comum a todos os microrganismos. Os gêneros *Escherichia*, *Enterobacter*, *Salmonella*, *Shigella*, *Clostridium*, *Streptococcus*, *Lactobacillus* e *Leuconostoc* possuem algumas espécies reconhecidas como produtoras de aminas bioativas (PERRY, 2004). Algumas destas bactérias estão presentes no queijo como parte de sua microbiota habitual, outras em decorrência de contaminação. Segundo Özogul e Hamed (2018), os gêneros *Enterococcus* e *Lactobacillus* são os principais produtores de tiramina. Algumas espécies de *Lactobacillus* também foram correlacionadas com acúmulo de histamina (DIAZ et al., 2018). *Enterococcus* é conhecido por produzir tiramina, putrescina e histamina, sendo comum também a formação de cadaverina, pela habilidade em descarboxilar a lisina. A presença dessas aminas em queijos tem sido proposta como indicador de higiene na obtenção do alimento, refletindo processos de decomposição ou deterioração.

Diferentes estratégias têm sido propostas com o objetivo de diminuir a concentração de aminas biogênicas em queijos. No entanto, a aplicação dessas técnicas depende muito das características do produto. Ênfase é dada à necessidade de melhorar as condições sanitárias durante a obtenção do leite, processamento e armazenamento do queijo como forma também de diminuir a formação de aminas biogênicas. Além de boas práticas de higiene, outras medidas devem ser implementadas para melhores resultados. Estas incluem a inibição de bactérias produtoras de aminas através da pasteurização ou irradiação do leite utilizado como matéria-

prima, redução dos tempos de maturação, adição de culturas iniciadoras e adjuntas com histórico conhecido, em relação à capacidade de formar aminas (BENKERROUM, 2016a). Entretanto, algumas dessas técnicas são inviáveis para serem aplicadas em queijos artesanais. Barone et al. (2018) destacaram a importância do pH, concentração de NaCl, tempo e temperatura de estocagem do queijo como parâmetros importantes na formação das aminas biogênicas. As características intrínsecas e extrínsecas que envolvem o queijo serão definitivas para favorecer ou impedir o crescimento microbiano. Torracca et al. (2016), avaliando o efeito do tratamento térmico e da maturação em “Caves” sobre a formação das aminas biogênicas em queijos artesanais, constataram que apesar da pasteurização ter sido uma etapa importante na redução das aminas, o ambiente de maturação contribuiu de forma significativa para o aumento da concentração dessas substâncias no produto final, inferindo sobre a necessidade de monitoramento dos parâmetros ambientais, atingindo os pontos críticos, como temperaturas elevadas e contaminação microbiana do local.

CAPÍTULO II
PERFIL FÍSICO-QUÍMICO, MICROBIOLÓGICO E IDENTIFICAÇÃO
PROTEÔMICA DE BACTÉRIAS ÁCIDO-LÁCTICAS DO QUEIJO
ARTESANAL FRESCO DA SERRA GERAL-MG

1. INTRODUÇÃO

Centenas de queijos artesanais são produzidos no mundo, sendo válido destacar a importância do setor e seu impacto mundial. Mulheres e homens envolvidos na agricultura familiar produzem 70% dos alimentos que abastecem o mundo (LICITRA et al., 2019). No Brasil, a fabricação de queijos artesanais se encontra difundida em todo o território, porém o estado de Minas Gerais se desponta como o principal produtor, detendo 25% da produção nacional e gerando renda para mais de 18.700 famílias (EMATER, 2021). Aliado a essa realidade de destaque no cenário brasileiro, com notável importância cultural, econômica e gastronômica, os produtores buscam visibilidade a partir de características específicas e peculiares inerentes de cada região.

“Entende-se por queijo artesanal mineiro o produto produzido com leite integral, fresco e cru, obtido de rebanho próprio ou, considerando a permissão mais recente, fornecido por outra propriedade, desde que seja constatada a qualidade sanitária emitida pela entidade de controle competente, que ateste o relacionamento entre o produtor de leite e a queijaria” (MINAS GERAIS, 2020). Essa legislação inclui os queijos Minas artesanal (QMA) e o meia-cura na categoria de produtos sem cozimento da massa e, ainda, contempla queijos como cabacinha e requeijão artesanal, com particularidades no processo produtivo, sendo realizado aquecimento da massa, porém com adição facultativa de soro-fermento.

O modo artesanal de produção do queijo é bastante variado. Em Minas Gerais, grande parte é elaborada com leite cru e adição de pingo, com tempo de maturação bastante diversificado e, em alguns casos, inexistente. Apesar da consolidação no processo produtivo em determinadas regiões, o queijo artesanal ainda é motivo de discussão no país, sob uma perspectiva, há uma busca pela caracterização, identidade e reconhecimento internacional do produto artesanal brasileiro. Em contrapartida a produção, em alguns casos, apresenta um cenário de informalidade com condições higiênico-sanitárias precárias.

No Norte de Minas Gerais, a região da Serra Geral se mantém como produtora de queijo artesanal, mesmo dividindo espaço com grandes produções agrícolas. A economia baseada na cadeia produtiva do leite envolve, diretamente, em torno de 15 mil famílias de agricultores

familiares e, indiretamente, mais outras 50 mil pessoas. Trata-se de uma produção de 15.000 peças de queijos, com movimentação financeira em torno de R\$ 195.000,00 por dia (EMATER, 2018; EMATER, 2020).

Tendo em vista a importância regional do queijo artesanal da Serra Geral-MG e compreendendo os fatores limitantes e interferentes na produção, objetivou-se avaliar as características físico-químicas e microbiológicas, além da identificação de bactérias ácido-láticas no leite, pingo e queijo artesanal fresco da Serra Geral. Adicionalmente, também foram avaliadas as propriedades físico-químicas e microbiológicas da água das queijarias e a presença de microrganismos nas bancadas de produção, para conhecimento da sua microbiota e possível rastreamento de pontos de contaminação de modo a contribuir na melhoria da qualidade do queijo.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Amostragem

Foram selecionados aleatoriamente 12 produtores de queijo artesanal da região da Serra Geral-MG, sendo seis produtores cadastrados no Serviço de Inspeção Municipal (PSIM) e seis que não possuíam cadastro em órgão fiscalizador (NSIM), caracterizando os últimos, como representantes da produção informal. As propriedades rurais envolvidas na pesquisa, estão distribuídas no município de Porteirinha-MG (latitude: 15° 44' 38" Sul, longitude: 43° 1' 29" Oeste), cidade escolhida pela maior representatividade produtiva da região, constituindo 150 queijarias e produtores cadastrados no serviço de inspeção municipal.

Os dois grupos de produtores formados, PSIM e NSIM, também se diferenciaram quanto ao fluxograma de produção, conforme indicado na figura II.1. As principais particularidades envolvem a incorporação de pingo, na proporção de 1 a 2 % do volume de leite utilizado e adição de água quente na massa após a coagulação, que atinge temperatura média de 40 °C.

Cada produtor forneceu duas peças inteiras de queijo (de aproximadamente 800 g) no primeiro dia de produção, sendo também coletados para análise, o leite cru utilizado como matéria prima, a água, o pingo (apenas para os produtores do grupo PSIM) e, ainda, foram realizados suabes das bancadas das queijarias.

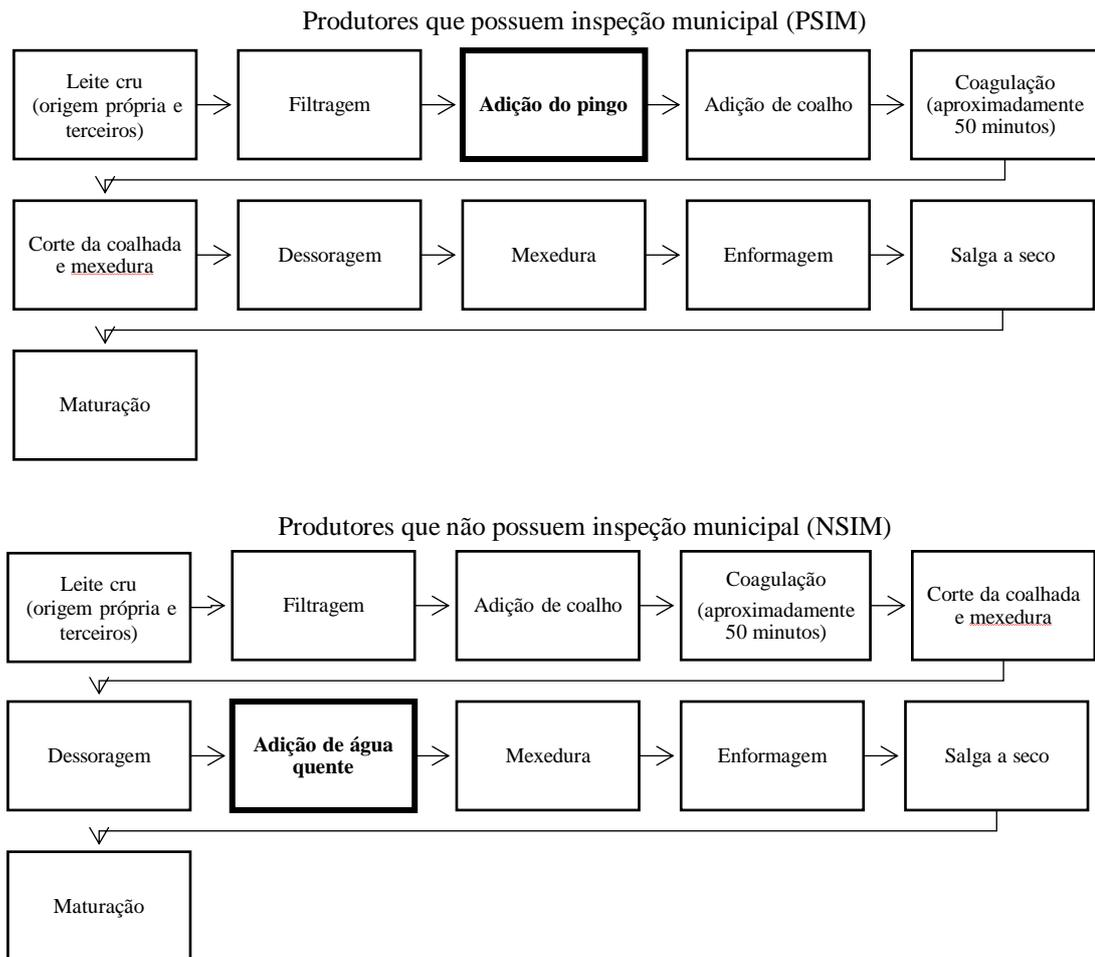


Figura II.1. Fluxogramas de produção para elaboração dos queijos artesanais da Serra Geral –MG, com e sem inspeção (PSIM e NSIM, respectivamente).

As coletas das amostras aconteceram no mês de julho mediante visitas às propriedades, sendo estas realizadas com o apoio dos técnicos da EMATER e do técnico do serviço de inspeção municipal, que atuaram como agentes de extensão. Os queijos foram envolvidos em embalagens de polietileno estéreis, e a água, leite e pingo foram acondicionados em frascos de polietileno também esterilizados, com capacidade de 300 mL. Para a contagem padrão em placas (CPP), o leite foi armazenado em frascos contendo o conservante azidiol, enquanto para a contagem de células somáticas (CCS) e composição química, as amostras foram acondicionadas em frascos contendo bronopol. O material foi encaminhado para realização das análises sob condições de refrigeração, em caixas isotérmicas com gelo, imediatamente após a coleta.

2.2 Análises laboratoriais

Os métodos de análises utilizados foram os indicados no escopo do Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento - MAPA para alimentos de origem animal e água (BRASIL, 2006; BRASIL, 2018). Todos os procedimentos analíticos foram realizados nos Laboratórios de Microbiologia de Alimentos e Análises Físico-químicas I do Departamento de Tecnologia e Inspeção de Produtos de Origem Animal da Escola de Veterinária da UFMG.

2.2.1 Análises físico-químicas e microbiológicas da água

As análises físico-químicas da água foram realizadas por meio das determinações de pH, acidez, cloro residual, alcalinidade e dureza, segundo os métodos descritos por Macêdo (2005). Para avaliação da qualidade microbiológica foram realizadas as contagens de coliformes totais, coliformes termotolerantes e mesófilos aeróbios (BRASIL, 2018).

2.2.2 Análises físico-químicas e microbiológicas do leite

Os teores percentuais de gordura, proteína, lactose, extrato seco total, extrato seco desengordurado e cinzas foram analisados pelo método de espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (IDF, 2013a), utilizando o equipamento LactoScope (Delta FTIR, Drachten, Frísia, Holanda). A contagem de células somáticas foi feita em equipamento Somascope (Delta FTIR, Drachten, Frísia, Holanda), utilizando a metodologia de citometria de fluxo (IDF, 2006). Para determinação da contagem padrão em placas foi utilizado o equipamento eletrônico Bactoscan FC (FOSS, Hillerød, Hovedstaden, Dinamarca) empregando a metodologia de citometria de fluxo (IDF, 2013b), sendo todas análises realizadas no Laboratório de Análise da Qualidade do Leite (LabUFMG) que compõe a Rede Brasileira de Laboratórios de Controle da Qualidade do Leite do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA).

Foram também avaliadas as contagens de coliformes totais, *Escherichia coli*, *Staphylococcus* spp., *Staphylococcus* coagulase positivo, *Salmonella* spp. (BRASIL, 2018) e bactérias ácido-láticas (BAL) (IDF, 1988; RESENDE et al., 2011). Além da quantificação, as BAL foram identificadas por técnica proteômica.

2.2.3 Análises físico-químicas e microbiológicas do pingo

Para caracterização físico-química do pingo foram realizadas as análises de pH, teor de acidez e extrato seco total utilizando técnicas recomendadas para leite fluído (BRASIL, 2018). Quanto à análise microbiológica, quantificou-se o grupo de coliformes totais, *Escherichia coli*, *Staphylococcus* spp., *Staphylococcus* coagulase positivo, bolor e leveduras, *Salmonella* spp. (BRASIL, 2018) e bactérias ácido-láticas (IDF, 1988; RESENDE et al., 2011). Além da quantificação, as BAL foram também identificadas por técnica proteômica.

2.2.4 Análises físico-químicas e microbiológicas do queijo

A composição química centesimal dos queijos foi avaliada por meio da determinação dos teores de gordura pelo método butirométrico, proteína utilizando o método de Kjeldahl, cinzas por meio da incineração a 550° C em forno mufla, umidade e sólidos totais a partir da secagem em estufa a 105 °C, pelo método gravimétrico. O pH foi determinado com auxílio de potenciômetro digital e a acidez titulável, expressa em ácido lático, por meio de titulação com NaOH 0,1 mol/L (BRASIL, 2006; BRASIL, 2018).

Os parâmetros microbiológicos avaliados no queijo foram coliformes totais, *Escherichia coli*, *Staphylococcus* spp., *Staphylococcus* coagulase positivo, bolor e leveduras, *Salmonella* spp. (BRASIL, 2018) e bactérias ácido-láticas (IDF, 1988; RESENDE et al., 2011). Além da quantificação, as BAL foram, ainda, identificadas por técnica proteômica.

2.2.5 Análises microbiológicas das bancadas da queijaria

Para identificação da microbiota presente nas bancadas das queijarias foram quantificados os microrganismos coliformes totais, *Escherichia coli*, *Staphylococcus* spp., *Staphylococcus* coagulase positivo, bolor e leveduras, *Salmonella* spp. e bactérias ácido-láticas. Além da quantificação, as BAL também foram identificadas por técnica proteômica. Para amostragem, foi friccionado o suabe estéril, embebido com água peptonada a 1% na superfície na bancada.

2.3 Metodologias utilizadas nas análises microbiológicas

Inicialmente, foi realizada a diluição decimal e seriada da amostra de leite, pingo, do material do suabe e queijo até 10^{-6} . Foram utilizadas $25 \pm 0,2$ g ou mL das amostras, pesadas e medidas assepticamente, sendo estas adicionadas em frasco estéril contendo 225 mL de solução salina peptonada a 1%, para quantificação de coliformes totais, *Escherichia coli*, *Staphylococcus* spp., *Staphylococcus* coagulase positivo, bolor e leveduras e bactérias ácido-láticas (BAL), enquanto 225 mL de solução peptonada 0,1% tamponada foram utilizadas para avaliação da presença da *Salmonella* spp., originando, dessa forma a diluição 10^{-1} .

Todos os microrganismos foram quantificados a partir da técnica de plaqueamento em superfície (*spread plate*) e incubação em condição de aerobiose.

2.3.1 Enumeração de coliformes totais e *E. coli* no leite, pingo, bancadas das queijarias e queijo

Inoculou-se 1 mL de cada diluição selecionada (10^{-2} , 10^{-4} , 10^{-6}) nas placas Petrifilm® (3M, Saint Paul, Minnesota, Estados Unidos) que posteriormente foram incubadas a 35 °C/24 h. Após essa etapa, apenas as colônias de coloração vermelha com presença de gás foram contadas e o resultado foi expresso em unidade formadora de colônia por grama (UFC/g). Para contagem das colônias de *Escherichia coli*, as mesmas placas usadas para os coliformes totais foram novamente incubadas por mais 24 horas e realizada a contagem somente das colônias de coloração azul e/ou vermelho-azulado com presença de gás, obtendo-se resultado em UFC/g.

2.3.2 Enumeração de *Staphylococcus* spp., *Staphylococcus* coagulase positivo no leite, pingo, bancadas das queijarias e queijo

Das diluições 10^{-2} a 10^{-6} das diferentes matrizes, foram retiradas alíquotas de 1 mL e inoculadas em placas contendo ágar Baird-Parker (Acumedia, Baltimore, Maryland, Estados Unidos), acrescido de gema de ovo e telurito de potássio (Himedia, Mumbai, Maharashtra, Índia) e incubadas a 36 °C/48 h. Após crescimento, foram quantificadas as colônias de *Staphylococcus* spp. e registradas as colônias típicas e/ou atípicas. Nas placas em que foram identificadas apenas um morfotipo, isolou-se cinco colônias e nas placas que foram observadas colônias típicas e atípicas, três de cada tipo foram selecionadas, inoculadas em tubos contendo caldo Brain Heart Infusion (BHI) (Oxoid, Basingstoke, Cheshire, Inglaterra) e incubadas em

estufa a 36 °C/24 h. Posteriormente, 300 µL do conteúdo do tubo e 300µL de plasma de coelho (Laborclin, Constantina, Rio Grande do Sul, Brasil) reconstituído foram adicionados em tubo estéril e incubados a 36 °C/24 h para averiguação da formação de coágulos e quantificação do *Staphylococcus* coagulase positivo (BRASIL, 2018).

2.3.3 Enumeração de bolores e leveduras no pingo e queijo

Foram retiradas alíquotas de 0,1 mL das diluições de 10⁻² a 10⁻⁶ e inoculadas em ágar batata dextrose (Himedia) 2%, adicionado de ácido tartárico a 10%. A incubação aconteceu em temperatura de 25 °C/ 7 dias (BRASIL, 2018).

2.3.4 Enumeração de bactérias ácido-láticas no leite, pingo, bancadas das queijarias e queijo

Alíquotas de 0,1 mL das diluições 10⁻² a 10⁻⁶ foram inoculadas em ágar Man-Rogosa-Sharpe (MRS) (Merck, Darmstadt, Hessen, Alemanha) e incubadas a 36 °C/48 h (IDF, 1988; RESENDE et al., 2011).

2.3.5 Pesquisa de presença de *Salmonella* spp.

Iniciou-se com a etapa de pré-enriquecimento em solução salina peptonada tamponada 1% e incubação da diluição 10⁻¹ em estufa a temperatura de 36 °C/20 h. Posteriormente, foi realizado o enriquecimento seletivo, transferindo 0,1 mL das amostras para o caldo Rappaport Vassiliadis (Vetec, Duque de Caxias, Rio de Janeiro, Brasil) e 1 mL para o caldo Selenito Cistina (Himedia) que foram acondicionados em tubos estéreis e encaminhados para o banho-maria a 41 °C/24 h. Em seguida, foram retiradas alíquotas dos caldos com alça de platina e estriadas em meios sólidos seletivos para o isolamento. Os meios utilizados foram: ágar Hektoen (Himedia), ágar verde brilhante vermelho de fenol lactose sacarose (Himedia) e ágar desoxicolato lisina xilose (Himedia). Foi realizado teste bioquímico nas colônias consideradas típicas utilizando o meio ágar rugai modificado (Renylab, Barbacena, Minas Gerais, Brasil), incubados em estufa a temperatura de 36 °C/ 24 h. Tubos com características suspeitas tiveram suas colônias isoladas em ágar nutriente e adicionalmente avaliadas a partir da reação sorológica frente ao anti-soro polivalente (Probac, São Paulo, São Paulo, Brasil) para *Salmonella* (BRASIL, 2018).

2.3.6 Enumeração de coliformes totais e termotolerantes na água

Utilizou-se a técnica do número mais provável (NMP). Alíquotas de 10,0 mL da amostra foram inoculadas em série de dez tubos contendo caldo Lauril Sulfato de Sódio (Himedia), concentração dupla (1ª série). Alíquotas de 1,0 mL da amostra foram inoculadas em uma série de dez tubos contendo caldo Lauril Sulfato de Sódio concentração simples (2ª série) e, por fim, alíquotas de 1,0 mL da diluição 10^{-1} da amostra de água foram inoculadas em uma série de 10 tubos contendo caldo Lauril Sulfato de Sódio concentração simples (3ª série). Os tubos de ensaio foram incubados em estufa a 35 ± 1 °C durante 24/48 h e todos continham os tubos de Durham invertidos, essa etapa constituiu a prova presuntiva.

Com auxílio da alça bacteriológica estéril, uma alíquota dos tubos positivos foi transferida para tubos contendo caldo verde brilhante bile lactose 2% (Himedia), sendo estes incubados a 35 ± 1 °C durante 24/48 h, para confirmação dos coliformes totais. Quanto aos coliformes termotolerantes, inoculou-se alíquota dos tubos de coliformes totais positivos em tubos com caldo EC (Himedia) que foram acondicionados em banho-maria a 45 ± 1 °C por 24/48 h. Foram considerados positivos, os tubos turvos e com formação de gás. O resultado foi expresso em NMP (BRASIL, 2018).

2.3.7 Enumeração de mesófilos aeróbios na água

Foi empregado o método de plaqueamento em profundidade (*pour plate*), utilizando alíquota de 1 mL das diluições 10^0 , 10^{-1} e 10^{-2} e meio de cultura ágar padrão (Acumedia), incubadas em estufas a temperatura de 36 °C/24 h (BRASIL, 2018).

2.4 Identificação de bactérias ácido-láticas por MALDI ToF

Foram identificadas as BAL presentes no leite, no pingo, na bancada das queijarias e no queijo fresco. Após o crescimento das colônias em meio MRS (36 °C/48 h), foram selecionadas até três colônias com características morfológicas distintas quanto ao tamanho, cor e aspecto, oriundas de todas as propriedades, nas diferentes matrizes. Os isolados foram transferidos para cápsulas microtubos contendo caldo BHI e 20% de glicerina para conservação sob congelamento a -18 °C.

Posteriormente ao descongelamento, as colônias foram ativadas e semeadas em placas MRS para isolamento. Após o crescimento das bactérias, o material foi encaminhado ao

Laboratório de Diagnóstico de Doenças dos Animais Aquáticos (Aquavet) da Escola de Veterinária para realização das análises pela técnica de espectrometria de massas por dessorção-ionização a laser, assistida por matriz - tempo de voo (MALDI-ToF) utilizando espectrômetro de massas FlexControl MicroFlex LT (Bruker Daltonics, Bremen, Alemanha). Uma única colônia bacteriana, fresca, foi retirada por vez das placas de Petri e transferida para uma placa alvo de aço inoxidável com adição subsequente de 1 μ L de ácido fórmico (70%) e 1 μ L de ácido α -ciano-4-hidroxicinâmico que, em seguida, foi acoplada ao equipamento. O espectro de massas gerado, de acordo com o perfil proteico das bactérias, foi comparado com informações do banco de dados. Para interpretação das pontuações, utilizaram-se os critérios recomendados pelo fabricante, que define os escores ≥ 2.000 a identificação em nível de espécie, de 1.700 a 2.000 indica uma identificação em nível de gênero e escores inferiores a 1.700 não foram associados a nenhum microrganismo (ASSIS et al., 2017).

2.5 Planejamento experimental e análise estatística

O delineamento experimental utilizado foi em blocos casualizados sendo os tratamentos dois grupos de produtores (PSIM e NSIM) compostos por seis produtores cada, sendo estes considerados as repetições. Os resultados foram testados quanto a distribuição normal pelo teste de Shapiro-Wilk e a homocedasticidade das variâncias pelo teste de Bartlett. As variáveis que não atenderam as pressuposições estatísticas foram avaliadas por meio de testes não-paramétricos para comparação de medianas.

As variáveis físico-químicas e microbiológicas não paramétricas, da água, leite, bancadas das queijarias e queijo foram comparadas entre os grupos de produtores por meio do teste de Wilcoxon Mann-Whitney, enquanto, para as variáveis paramétricas, utilizou-se o teste F. Para o pingou, por ser utilizado apenas pelo grupo de produtores PSIM, foi empregada a estatística descritiva, obtendo-se os valores médios, mínimos, máximos e coeficiente de variação de todas as variáveis.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Qualidade físico-química e microbiológica da água utilizada nas queijarias artesanais da Serra Geral - MG

Os parâmetros físico-químicos e microbiológicos analisados na água das queijarias estão apresentados na tabela II.1. Pode-se observar que não houve diferença estatística ($p > 0,05$), quando comparada a qualidade da água oriunda de propriedades que possuem o serviço de inspeção municipal (PSIM) e as que não possuem (NSIM). Quanto ao enquadramento da água aos parâmetros físico-químicos exigidos pela legislação, apenas uma amostra do grupo PSIM não atingiu o intervalo permitido de pH, apresentando valor de 5,57. Ainda, duas amostras de água estavam em desacordo, ou seja, acima do limite estabelecido para cloro residual, sendo uma amostra pertencente à queijaria do grupo PSIM e outra, à queijaria do grupo NSIM. Este fato se deve, provavelmente, à cloração manual e a instalação de clorador de passagem, fato acontecido nas queijarias conforme constatação a campo. Ações corretivas se fazem necessárias até que a água apresente resultados satisfatórios, seguindo a recomendação da legislação para queijos artesanais, que preconiza a realização do controle de cloro diariamente na propriedade, antes do início das atividades, mantendo a concentração exigida (Tabela II.1).

As propriedades físico-químicas definem as características do corpo hídrico, levando a inferências sobre o impacto que a água pode causar dentro das propriedades. Os resultados apontam uma qualidade adequada, apresentando resultados para os parâmetros de pH, dureza e cloretos com valores médios e medianos que se enquadram na legislação em vigor (Tabela II.1). Baseado nos valores obtidos, trata-se de uma água mole com mínimas quantidades de deposição mineral, indicando pequeno risco de formação de incrustações e de processos corrosivos em utensílios e materiais dentro das queijarias.

A água das queijarias estudadas tem como origem principal o fornecimento realizado pela Companhia de Saneamento de Minas Gerais (COPASA), totalizando o abastecimento em 66,7% ou oito propriedades, sendo cinco delas pertencentes ao grupo de produtores PSIM. Nas propriedades restantes, a água de 25,3% é oriunda da nascente do rio do Serrado (três propriedades) enquanto uma (8%) utiliza água captada da chuva, sendo esta armazenada em reservatório específico e clorada de acordo com a recomendação do fabricante da caixa.

Tabela II.1. Valores médios, medianas e coeficiente de variação (CV) dos parâmetros físico-químicos e microbiológicos encontrados em amostras de água utilizada nas queijarias da região da Serra Geral-MG

Parâmetros	PSIM			NSIM			P-valor	Padrão ¹
	Média/ Mediana	CV (%)	Enquadramento na legislação (%)	Média/ Mediana	CV (%)	Enquadramento na legislação (%)		
Físico-químicos								
pH *	6,30a	5,5	83,3	6,48a	1,9	100	0,13	6 a 9,5
Acidez (mg/L de CO ₂)*	3,18a	62,6	100	2,31a	33,2	100	0,07	-
Alcalinidade (mg/L)*	10,05a	90,2	100	10,98a	30,3	100	0,58	-
Dureza (mg/L de CaCO ₃)**	6,70a	44,9	100	8,35a	35,5	100	0,38	Máx. 500
Cloreto (mg/L)*	18,70a	34,6	100	4,39a	49,9	100	0,06	Máx. 250
Cloro residual (mg/L)*	1,97a	119,9	83,3	1,56a	34,4	83,3	0,06	0,2 a 2,0
Microbiológicos								
Mesófilos aeróbios (UFC/mL)**	1,27 x 10 ² a	168,5	83,3	1,95 x 10 ² a	221,6	83,3	0,74	-
Coliformes totais (NMP/100 mL)*	<0,9a	124,5	66,7	7,9 x 10 ⁰ a	119,3	50,0	0,31	Ausente
Coliformes termotolerantes (NMP/100 mL)*	<0,9a	124,5	66,7	7,9 x 10 ⁰ a	119,4	50,0	0,31	Ausente

* Medianas ** Médias; PSIM = produtores que possuem inspeção municipal; NSIM = produtores não possuem inspeção municipal.

¹ Padrão de potabilidade de água de abastecimento baseado na Portaria nº 2.914 (BRASIL, 2011) e Portaria 2033 (IMA, 2021a). Médias seguidas de letras minúsculas distintas na mesma linha diferem entre si pelo teste F ou medianas seguidas de letras minúsculas distintas, na mesma linha, diferem entre si pelo teste Wilcoxon Mann-Whitney (p<0,05).

Para ser considerada potável, a água deve apresentar características físico-químicas e microbiológicas conforme exigências definidas em legislação específica. A Portaria nº 1837 do Instituto Mineiro de Agropecuária (IMA), de julho de 2018 (MINAS GERAIS, 2018), contempla esses parâmetros, alinhando com o que é preconizado para água de abastecimento na Portaria nº 2914 do Ministério da Saúde (BRASIL, 2011) (Tabela II.1).

Quanto aos resultados microbiológicos obtidos para a água das queijarias da região da Serra Geral, observa-se que pelo menos uma amostra pertencente a cada grupo estava em desacordo com o limite preconizado pela legislação, apontando recontaminação da água após a etapa de cloração ou falha no tratamento.

Os valores médios obtidos para a contagem de mesófilos aeróbios da água, dos dois grupos de produtores avaliados, apresentaram qualidade adequada quanto ao parâmetro. No entanto, os valores medianos de coliformes totais e de coliformes termotolerantes estão acima do limite estabelecido pela legislação. A água pode servir de veículo para a contaminação do queijo, sendo esses microrganismos os possíveis responsáveis pelo aparecimento de defeitos no produto. É importante ressaltar que a água em questão é utilizada para limpeza de instalações, materiais, utensílios, mãos de manipuladores, diluição do coalho e ainda, em alguns queijos, adicionada a coalhada durante o processamento. Pereira et al. (2014), avaliando os sistemas de abastecimento de água em queijarias artesanais da microrregião Campo das Vertentes em Minas Gerais, constataram que aproximadamente 60% das queijarias estudadas apresentaram contaminação por coliformes totais na água.

Fazer o acompanhamento da água nas queijarias, mantendo as características físico-químicas e microbiológicas adequadas é fundamental para garantir a qualidade do queijo. Filtros e cloradores devem ser adaptados e são de uso obrigatório (MINAS GERAIS, 2020).

3.2 Qualidade físico-química, microbiológica e contagem de células somáticas do leite utilizado como matéria-prima para fabricação dos queijos artesanais da Serra Geral-MG

A média e o coeficiente de variação definindo as características encontradas no leite cru podem ser observados na tabela II.2. Não houve diferença estatística ($p > 0,05$) entre os resultados da composição química, CPP e CCS quando comparados os dois grupos de produtores de queijo. Nota-se, ainda, que os resultados de composição química do leite atendem os requisitos mínimos exigidos pela legislação, conforme definição de padrão apresentado na tabela II.2. É sabido que não existe legislação específica que defina a qualidade da matéria-prima utilizada para a produção de queijo artesanal de Minas. Dessa forma, foram utilizadas

como referências a IN 76 (BRASIL, 2018) e o Decreto Estadual nº 42.645 (MINAS GERAIS, 2002).

A pequena variação encontrada, associada aos valores do coeficiente de variação (CV), nos resultados dos parâmetros físico-químicos, pode ser atribuída a pequenas diferenças nas condições de produção de leite da região, com predominância de vacas mestiças, alimentadas a pasto com suplementação de volumoso na época da seca. A composição do leite e, conseqüentemente, suas propriedades estabelecem fortemente a qualidade e a aptidão desse alimento para o processamento e consumo humano. Dessa forma, elevadas concentrações de sólidos, incluindo principalmente os componentes gordura e proteína, definem o rendimento dos queijos, além das características de textura, cor e sabor.

Dentre os produtores que participaram da pesquisa, 33,3% (duas queijarias) pertencentes ao grupo PSIM e 66,7% (quatro queijarias) do grupo NSIM utilizaram leite advindo de outras propriedades. A legislação atual para queijos artesanais (MINAS GERAIS, 2020) permite o fornecimento de leite à queijaria situada em outra propriedade sendo este condicionado à obtenção de título de relacionamento, que ateste a relação entre o produtor de leite, de origem determinada, e a queijaria. O leite utilizado como matéria-prima para a produção do queijo artesanal da Serra Geral é um dos grandes entraves da produção frente à busca do regulamento específico para o produto. Isso se deve ao fato, de um número expressivo, considerando a maioria dos produtores da região, que utilizam a compra de leite de terceiros para o processamento do queijo, não possuindo rebanho próprio para subsidiar a produção. Ainda, conforme constatado em observação a campo, alguns produtores fazem a aquisição de leite de vários fornecedores sem controle sanitário e com distâncias significativas da propriedade produtora até a queijaria.

As contagens médias de células somáticas nos dois grupos foram satisfatórias, atendendo o máximo de $4,0 \times 10^5$ células/mL que é preconizado pela legislação (MINAS GERAIS, 2002). Entretanto, pode-se observar na tabela II.2 que 50% do leite cru pertencentes aos produtores NSIM e 16,7% do leite cru pertencentes aos produtores PSIM, apresentaram valores que extrapolam o limite estabelecido. Segundo Olivers, Peres e Molina (2019), está elucidada a influência de elevadas CCS na composição do leite, tendo como consequência a diminuição dos teores de lactose e o aumento de proteínas séricas em função do aumento da permeabilidade da membrana dos alvéolos. Ainda, pode ocorrer um comprometimento da caseína pela acentuada proteólise. Nessa condição, estes autores também afirmaram o efeito negativo sobre o processamento do queijo e sobre a qualidade do produto, podendo ser notado, uma inadequada sinerese e aumento do teor de umidade, além do menor rendimento.

Tabela II.2. Valores médios, medianas e coeficiente de variação (CV) da composição química, contagem padrão em placas (CPP) e contagem de células somáticas (CCS) do leite utilizado no processamento do queijo artesanal da Serra Geral-MG

Parâmetros	PSIM			NSIM			P-valor	Padrão ¹
	Média/ Mediana	CV (%)	Enquadramento na legislação (%)	Média/ Mediana	CV (%)	Enquadramento na legislação (%)		
CCS (células/mL)**	2,88 x 10 ⁵ a	69,9	83,3	3,37 x 10 ⁵ a	83,7	50,0	0,67	Máx. 4,00 x 10 ⁵
Físico-químicos								
Gordura (g/100 mL)**	3,68 a	19,0	100	3,80 a	16,4	100	0,77	Mín. 3,0%
Proteína (g/100 mL)**	3,34 a	10,1	100	3,40 a	11,4	100	0,79	Mín. 2,9%
Lactose (g/100 mL)**	4,47 a	1,9	100	4,48 a	1,7	100	0,92	Mín. 4,3%
EST (g/100 mL)**	12,49 a	7,8	100	12,66 a	7,3	100	0,77	Mín. 11,4%
ESD (g/100 mL)**	8,81 a	3,5	100	8,86 a	3,7	100	0,76	Mín. 8,4%
Microbiológicos								
CPP (UFC/mL)**	2,86 x 10 ⁵ a	227,2	83,3	2,87 x 10 ⁴ a	152,8	100	0,38	Máx. 1,0 x 10 ⁵
Coliformes totais (UFC/mL)*	8,50 x 10 ² a	232,9	-	2,70 x 10 ³ a	244,8	-	0,93	-
<i>Escherichia coli</i> (UFC/mL)**	<1,00 x 10 ² a	186,2	83,3	<1,00 x 10 ² a	146,9	83,3	0,99	<1,0 x 10 ²
<i>Staphylococcus</i> spp. (UFC/mL)**	5,22 x 10 ⁵ a	135,7	-	6,39 x 10 ⁵ a	144,7	-	0,98	-
<i>Staphylococcus</i> coag. positivo (UFC/mL)**	2,02 x 10 ⁵ a	229,9	16,6	2,23 x 10 ⁵ a	241,5	16,7	0,87	<1,0 x 10 ²
Bactérias ácido-láticas (UFC/mL)*	1,60 x 10 ⁵ a	219,4	-	6,80 x 10 ⁴ a	95,7	-	0,20	-

* Medianas ** Médias; PSIM = produtores que possuem inspeção municipal; NSIM = produtores não possuem inspeção municipal.

¹ Padrão baseado no Decreto Estadual nº 42.645 (2002) e Instrução Normativa nº 76 (2018); EST = extrato seco total; ESD = extrato seco desengordurado; CPP= contagem padrão em placas. Médias seguidas de letras distintas na mesma linha diferem entre si pelo teste F (p<0,05) ou medianas seguidas de letras minúsculas distintas, na mesma linha, diferem entre si pelo teste Wilcoxon Mann-Whitney (p<0,05).

Quanto ao parâmetro CPP, observa-se que não houve diferença estatística ($p>0,05$) entre os grupos avaliados. Entretanto, o leite cru do grupo de produtores sob inspeção municipal (PSIM) apresentou média superior ao máximo exigido e uma amostra que não se enquadrava na legislação, atingindo o valor de $1,6 \times 10^6$ UFC/mL. Segundo Franceschi et al. (2020), a CPP elevada aponta para uma inadequada prática higiênica na obtenção e conservação do alimento.

Na tabela II.2 são apresentados os valores médios das contagens microbiológicas do leite utilizado para elaboração do queijo artesanal da Serra Geral-MG, com resultados para os parâmetros de coliformes totais, *Escherichia coli*, *Staphylococcus* spp., *Staphylococcus* coagulase positivo e BAL. Não foi observada diferença significativa ($p>0,05$) entre o leite dos grupos de produtores avaliados, constatando que a matéria-prima encontra-se microbiologicamente imprópria para o beneficiamento do queijo artesanal, com elevadas contagens de *Staphylococcus* coagulase positivo, estando em discordância com os valores limites estabelecidos na legislação (MINAS GERAIS, 2002).

Apesar da inexistência de um padrão na legislação para leite cru, é relatado na literatura que contagem de coliformes totais acima $1,0 \times 10^3$ UFC/mL indicam de obtenção precária do produto (CITADIN et al., 2009). No presente estudo, quantidades elevadas de coliformes totais foram encontradas nos queijos artesanais da Serra Geral-MG oriundos do NSIM. Em contrapartida, para *Escherichia coli*, os resultados foram inferiores a 100 UFC/mL em ambos os grupos de produtores. A realidade definida no presente estudo foi semelhante ao observado em outras regiões do estado, como Serra do Salitre (FIGUEIREDO, 2018), Campo das Vertentes (CASTRO et al., 2016), Serro (MARTINS et al., 2015) e Araxá (SALES, 2015).

Metz et al. (2020), avaliando o uso de coliformes totais e *E. coli* como indicadores de qualidade sanitária em leite cru destinado para o processamento de queijos, constataram que mais de 90% das amostras oriundas da Bélgica, Escócia, Irlanda e Itália, apresentavam-se com níveis <100 UFC/mL de *E. coli* e observaram também baixas quantidades ou ausência desse microrganismo no leite. Os coliformes não são inerentes à microbiota do leite cru, a origem desse tipo de contaminação pode ser a água, o ambiente, ordenhador e/ou equipamento de ordenha devido a falhas na higienização. *Escherichia coli* também é veiculada por práticas deficientes de limpeza em etapas da produção do leite, no entanto, é encontrada como habitante do trato digestivo de animais, por isso, utilizada como indicativo de contaminação fecal. Algumas cepas não são patogênicas, enquanto outras são causadoras de doenças graves como, infecção urinária, colite hemorrágica, síndrome hemolítico-urêmica e diarreia (JAY, 2005; METZ et al., 2020).

As investigações científicas utilizam amplamente a quantificação de *Staphylococcus* coagulase positivo em leite e derivados, o que contribui para estimativas inferiores da real prevalência de cepas produtoras de enterotoxinas já que *Staphylococcus* coagulase negativo também demonstram capacidade de síntese das toxinas (ANDRADE et al., 2019). Dessa forma, a discussão da contagem de *Staphylococcus* spp. gera informações imprescindíveis para que seja possível inferir sobre a qualidade e segurança dos alimentos. Contagens superiores a $1,0 \times 10^2$ UFC/mL de *Staphylococcus* spp. e *Staphylococcus* coagulase positivo foram encontrados no leite cru utilizado pelos produtores de queijo artesanal da Serra Geral (PSIM e NSIM). Ainda, no caso do *Staphylococcus* coagulase positivo, 83,33% das amostras, em ambos os grupos, não atenderam o limite preconizado na legislação (Tabela II.2). Vários estudos demonstraram a ocorrência de contaminação por esse grupo de microrganismo no leite cru utilizado para produção de queijo Minas artesanal, incluindo em queijos pertencentes as propriedades cadastradas e não cadastradas no serviço de inspeção do IMA (OLIVEIRA, 2014; CASTRO et al., 2016). *S. aureus* é um importante agente da mastite bovina, podendo ser facilmente encontrado em leite cru proveniente de rebanhos que apresentam mastite subclínica (ECKERSALL et al., 2006).

Deve-se ressaltar que, embora não conste no padrão microbiológico exigido pela legislação, a enumeração limite para *Staphylococcus* coagulase positivo, utilizou-se como referência desse parâmetro a exigência para *Staphylococcus aureus*, portanto, a comparação de enquadramento legal pode não ser conclusiva (MINAS GERAIS, 2002).

Apesar de ter havido elevadas contaminações do leite por microrganismos patogênicos, não foi constatada a presença da *Salmonella* spp. no leite cru avaliado. O alto índice de não conformidades dos parâmetros microbiológicos verificado na região da Serra Geral pode estar condicionado à captação de leite de terceiros para o processamento do queijo, o que dificulta que medidas de higiene na ordenha, condição de transporte, temperatura do leite, tempo até a chegada à queijaria, sejam controladas. Mudanças de procedimentos deverão ser adotadas para que ocorra a melhoria da qualidade, devendo ser considerados alguns pontos de contaminação como: saúde da vaca em lactação, qualidade da água utilizada na ordenha, sujidades provenientes do úbere, mãos do ordenhador, equipamentos de ordenha, utensílios, latões e baldes mal higienizados.

Diferente do que foi discutido sobre outros grupos microbianos, as BAL representam microrganismos desejáveis presentes no leite, no pingo e, conseqüentemente, nos queijos artesanais, contribuindo para as características satisfatórias de textura e sabor desse derivado lácteo, além de provável inibição de patógenos (ÖZOGUL e HAMED, 2018). Não foi

encontrada diferença estatística ($p > 0,05$) entre as contagens de BAL no leite cru, quando comparado os grupos de produtores de queijos avaliados, sendo os valores médios encontrados na ordem de 10^4 a 10^5 UFC/mL. Castro et al. (2016) avaliando o leite de propriedades da região do Campo das Vertentes-MG, encontraram valores médios variando de $1,6 \times 10^4$ a $5,0 \times 10^5$ UFC/mL na época das águas e na época da seca, respectivamente.

3.3 Qualidade físico-química e microbiológica do pingo

Na tabela II.3 estão descritos os resultados das características do pingo apenas para os produtores PSIM, os quais o utilizam no processamento do queijo. Foi observado um alto CV para o parâmetro acidez, atingindo valor mínimo de 0,12 e máximo de 0,81 g de ácido láctico/100 mL. Essa variabilidade pode ser atribuída à prática recente de utilização do fermento natural na região, sendo relatada pelos próprios produtores, a falta de conhecimento e experiência para obtenção e uso do produto. No entanto, em regiões com tradição do uso de pingo, ainda é constatado uma falta de padronização na elaboração e aproveitamento desse fermento, com utilização variada do próprio volume (SALES, 2015).

Tabela II.3. Valores médios, coeficientes de variação (CV), valores mínimos e máximos da qualidade físico-química e microbiológica do pingo utilizado no processamento do queijo artesanal da Serra Geral-MG dos produtores pertencentes ao grupo PSIM

Parâmetros	Média	CV (%)	Mínimo	Máximo
pH	5,86	11,9	4,78	6,49
Acidez titulável (g de ácido láctico/100 mL)	0,36	64,1	0,12	0,81
Extrato seco total (g/100 mL)	38,72	5,8	36,19	43,07
Coliformes totais (UFC/mL)	$2,40 \times 10^7$	216,0	$3,50 \times 10^3$	$1,40 \times 10^8$
<i>Escherichia coli</i> (UFC/mL)	$3,12 \times 10^5$	177,0	$<1,00 \times 10^2$	$1,50 \times 10^6$
<i>Staphylococcus</i> spp. (UFC/mL)	$4,12 \times 10^6$	118,4	$1,56 \times 10^5$	$1,45 \times 10^7$
<i>Staphylococcus</i> coag. positivo (UFC/mL)	$7,60 \times 10^5$	208,5	$<1,00 \times 10^2$	$4,30 \times 10^7$
Bolores e leveduras (UFC/mL)	$1,79 \times 10^4$	222,1	$<1,00 \times 10^2$	$1,07 \times 10^5$
Bactérias ácido-láticas (UFC/mL)	$9,59 \times 10^7$	207,4	$7,00 \times 10^4$	$5,40 \times 10^8$

Embora os resultados do presente estudo definam o pingo como ácido, valores inferiores de pH são comumente reportados na literatura. Rafael (2017), avaliando a qualidade do pingo oriundo do QMA da Serra da Canastra de 20 produtores cadastrados, encontrou média de pH de 4,91 e 0,55 g de ácido láctico/100 mL. Nesta mesma região, Nóbrega et al. (2008) encontraram pH variando de 4,06 a 5,40 e acidez titulável de 0,4 a 1,1 g de ácido láctico/100 mL no pingo na época da seca. Figueiredo (2018), estudando o QMA da Serra do Salitre em diferentes épocas

do ano, encontrou diferença significativa para o pH do fermento natural com valores de 5,12 na época da seca e 5,91 na época das chuvas. Segundo Pinto (2008), é desejável a utilização de pingos com pH inferior a 4,4, uma vez que neste pH há inibição do crescimento da microbiota patogênica.

Considerando ainda a inexperiência dos produtores da região da Serra Geral na produção do pingo, foi verificada um alto teor de extrato seco total nesse produto, apontando uma perda de componentes que poderiam ter sido incorporados à massa do queijo e que provavelmente comprometeram o rendimento da produção. Visualmente, foi possível identificar, em alguns casos, uma coloração branca do líquido, com sólidos que se depositavam no fundo do frasco da coleta, chegando até a separação de fases.

Quanto às análises microbiológicas, todas as contagens estavam elevadas, ainda que não haja valores limites definidos na legislação. Na averiguação da possível presença de *Salmonella* spp. no pingo, constatou-se que nenhuma amostra estava contaminada, assim como apresentado para o resultado do leite cru, diminuindo, dessa forma, a probabilidade de veicularem esse patógeno para o queijo.

Considerando a importância que o leite cru e o pingo representam para a definição da qualidade do queijo artesanal, estando eles interligados, um gráfico contrapondo os valores médios em log UFC/mL de coliformes totais, *E. coli*, *Staphylococcus* spp. e *Staphylococcus* coagulase positivo (Figura II.2) é apresentado sobre os produtos em questão. Nota-se que houve diferença estatística ($p < 0,05$) quando comparadas as contagens de coliformes totais no pingo, que se destacaram superiores ao leite. Esse resultado demonstra que a etapa de obtenção do pingo propicia um aumento da sua contaminação, ou seja, promove efeito adicional das bactérias que estavam presentes no leite. As características intrínsecas do pingo, como o pH, acidez e teores de sal não foram suficientes para impedir a sobrevivência e multiplicação dos microrganismos indesejáveis. Ainda, deve-se considerar a influência do acondicionamento do pingo em temperatura ambiente, favorecendo a fase logarítmica de crescimento dessas bactérias. O pingo pode ser responsável pela propagação de microrganismos contaminantes para a massa do queijo, assim, forma-se um ciclo de propagação, uma vez que o soro proveniente do queijo contaminado se transforma no pingo do dia seguinte (OLIVEIRA, 2014).

O leite e o pingo apresentaram valores médios semelhantes ($p > 0,05$) quanto as contagens de *E. coli*, *Staphylococcus* spp. e *Staphylococcus* coagulase positivo. É comum a presença desses microrganismos no pingo quando ocorrem deficiências nos processos de higienização na queijaria durante a manipulação e coleta desse fermento natural, especificamente os *Staphylococcus* que apresentam tolerância ao sal e resistência à condição

ácida do meio, o que pode levar à modificação na microbiota, selecionando microrganismos halofílicos. Segundo Jay (2005), algumas linhagens de *S. aureus* podem crescer em até 20% de sal. Castro et al. (2016) encontraram contagens elevadas de *Staphylococcus* coagulase positivo no pingo na microrregião dos Campos das Vertentes no período da chuva (5,38 log UFC/mL), em relação ao período da seca (< 3,0 log UFC/mL). Por outro lado, Martins et al. (2015) encontraram valores de 2,46 log UFC/mL no período seco e 2,41 log UFC/mL no período chuvoso.

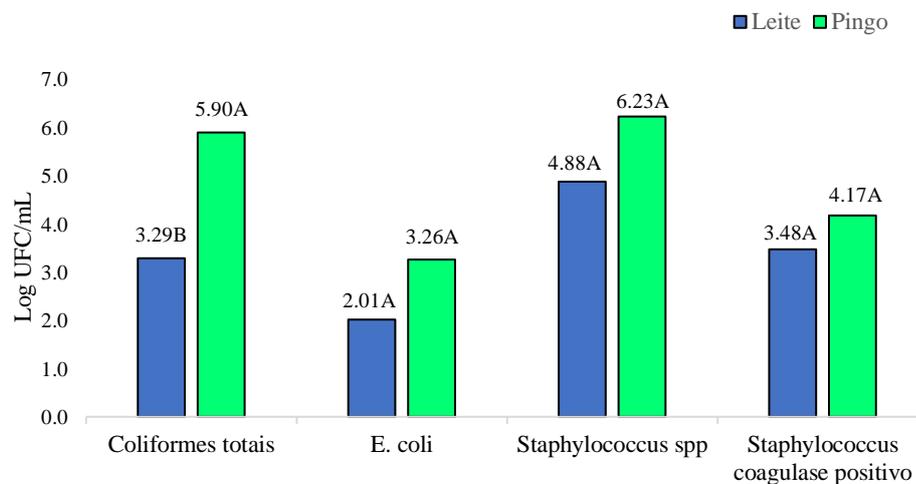


Figura II.2. Contaminação microbiológica de leite e do pingo utilizado no processamento do queijo artesanal da Serra Geral. Médias seguidas por letras maiúscula, distintas, diferem leite e pingo, pelo teste F ($p < 0,05$).

As contagens de BAL encontradas no pingo da região da Serra Geral-MG, com média na ordem de 10^7 , confirmam a abundância desse soro-fermento, servindo como veiculador de bactérias desejáveis para o queijo. A utilização do pingo, rico em BAL, promove a inserção de uma microbiota complexa e diversificada ao produto, conferindo características físicas, químicas e sensoriais específicas, representativas da região na qual o produto é produzido (NÓBREGA et al., 2008). Segundo Pinto (2008), quanto maior a contagem de BAL maiores serão os efeitos antagônicos sobre os patógenos, sendo constatado o efeito inibitório do crescimento de *Listeria innocua* e *Listeria monocytogenes*.

Analisando a quantidade de bolores e leveduras é possível verificar que o pingo pode também ser fonte desse grupo de microrganismos para o queijo. No entanto, até o presente momento não há parâmetros legais que definam a presença de fungos filamentosos e leveduras no QMA e nem tão pouco nos queijos artesanais de Minas, apesar da valorização e demanda pelos consumidores. Como a microbiota dos queijos artesanais é variada, argumentos

controversos são relatados, sendo contraposto efeitos indesejáveis, que comprometem a inocuidade e qualidade do queijo pela ação deteriorante, mas também acentuando características favoráveis relacionadas principalmente as propriedades sensoriais. Segundo Mehlomakulu (2011), algumas leveduras são associadas à alta atividade lipolítica e proteolítica com importante contribuição para a maturação dos queijos.

3.4 Qualidade microbiológica das bancadas das queijarias artesanais da Serra Geral – MG

Na tabela II.4 estão apresentados os dados da contaminação microbiana presente nas bancadas de ardósia (rocha metamórfica, sílico-argilosa) (dez queijarias) e aço inoxidável (duas queijarias) pertencentes à região da Serra Geral-MG. Foi observada diferença significativa ($p < 0,05$) quando comparados os grupos dos produtores, estando o PSIM com valores superiores de *Staphylococcus* spp. e bactérias ácido-láticas. A superfície em contato com o queijo pode ser responsável por uma possível contaminação durante o processamento e armazenamento do produto. Contagens elevadas de microrganismos, principalmente *Staphylococcus* spp., foram constatadas, o que demonstra condições inadequadas de higienização das bancadas.

Apesar dos indícios da presença de microrganismos nas superfícies das bancadas, sugere-se estudos específicos que avaliem a formação de biofilmes em bancadas de ardósia e aço inoxidável em queijarias artesanais, para que sejam elaboradas estratégias de controle de patógenos e deteriorantes. A simples presença do microrganismo na superfície de um material não caracteriza a formação do biofilme. Os microrganismos depositam-se, aderem, interagem com as superfícies e iniciam o crescimento celular, sendo constituído de células viáveis ou não, ancorados em determinado material através de substâncias poliméricas extracelular que lhes conferem capacidade de adesão (CHMIELEWSKI e FRANK, 2003; ANDRADE, 2008). De acordo com Phillips et al. (2010), bactérias em estado planctônico como *Staphylococcus* e *E. coli* podem formar e desenvolver biofilme completo dentro de dois a quatro dias se a população e ambiente forem favoráveis. Nessa condição, se tornam mais resistentes às substâncias sanitizantes.

Tabela II.4. Medianas, coeficientes de variação (CV), valores mínimos e máximos da qualidade microbiológica das bancadas das queijarias artesanais da Serra Geral-MG

Parâmetros (UFC/unidade)	PSIM				NSIM				p- valor
	Mediana	CV (%)	Mínimo	Máximo	Mediana	CV (%)	Mínimo	Máximo	
Coliformes totais	5,34 x 10 ⁴ a	153,9	<1,00 x 10 ²	1,30 x 10 ⁷	<1,0 x 10 ² a	244,3	<1,00 x 10 ²	1,10 x 10 ⁷	0,15
<i>Escherichia coli</i>	<1,00 x 10 ² a	182,5	<1,00 x 10 ²	8,00 x 10 ²	<1,0 x 10 ² a	244,2	<1,00 x 10 ²	2,00 x 10 ⁴	0,99
<i>Staphylococcus</i> spp.	9,40 x 10 ⁵ a	157,1	2,00 x 10 ³	1,06 x 10 ⁷	1,55 x 10 ³ b	177,0	<1,00 x 10 ²	2,00 x 10 ⁵	0,04
<i>Staphylococcus</i> coagulase positivo	<1,00 x 10 ² a	243,9	<1,00 x 10 ²	1,06 x 10 ⁷	<1,0 x 10 ² a	179,7	<1,00 x 10 ²	1,40 x 10 ⁴	0,84
Bactérias ácido-láticas	1,40 x 10 ⁶ a	199,5	1,00 x 10 ⁵	6,10 x 10 ⁷	<1,0 x 10 ² b	159,3	<1,00 x 10 ²	1,13 x 10 ⁵	0,004

PSIM = produtores que possuem inspeção municipal; NSIM = produtores não possuem inspeção municipal.

Medianas seguidas de letras minúsculas distintas, na mesma linha, diferem entre si pelo teste Wilcoxon Mann-Whitney (p<0,05).

Outro fator influenciador é o tipo de material. Algumas estruturas são mais susceptíveis à deposição microbiana. Segundo Andrade (2008), superfícies irregulares com possibilidade de apresentar fendas, ranhuras e fissuras podem dificultar a higienização, permitindo dessa forma, a multiplicação microbiana originando processo de adesão e formação de biofilme. Cruzado-Bravo et al. (2019), pesquisando o comportamento de *Staphylococcus* spp. isolados de leite e queijo, verificaram o potencial deste microrganismo em formar biofilme no aço inoxidável e em polipropileno. Melo et al. (2012), ao analisarem *S. aureus* isolados de mastite bovina, observaram que 98,9%, de um total de 94 cepas estudadas, foram capazes de formar biofilme. A espécie bacteriana pode afetar a síntese do biofilme. Com *E. coli*, por exemplo, o desenvolvimento é comum devido a apêndices de superfícies como flagelos, pili e fímbrias de vários comprimentos que se projetam permitindo que o microrganismo se ligue à superfície proporcionando a formação (SHARMA e BEARSON, 2013).

Sob outra perspectiva, as concentrações de BAL nas bancadas com quantificações até 10^6 (grupo PSIM) indicam uma fonte interessante de veiculação de bactérias desejáveis para o queijo artesanal. Sabendo-se que o perfil de BAL é definido a partir do contato com o ambiente, identificar a qualidade microbiológica do local de produção e armazenamento do queijo durante a maturação é importante. Segundo Licitra et al. (2017), o local onde os queijos são acondicionados funciona como reservatório de microrganismos, entre eles as BAL, contribuindo para a qualidade do queijo. Além disso, os biofilmes que podem formar na superfície tendem a ser seguros em função da capacidade de limitar a implantação de patógenos com mecanismos que precisam ser explorados.

3.5 Qualidade físico-química e microbiológica do queijo artesanal fresco da Serra Geral-MG

A média, a mediana e o coeficiente de variação encontrados para as características do queijo fresco estão apresentados na tabela II.5. Considerando as propriedades físico-químicas, observa-se que houve diferença ($p < 0,05$) para o pH, gordura, umidade e sólidos totais quando comparado os queijos dos produtores PSIM e NSIM. O queijo fresco pertencente ao PSIM apresentou-se mais ácido e com teores médios superiores de gordura e umidade. Essas características podem estar associadas à incorporação de pingo por esse grupo de produtores, bem como, pelas etapas distintas no processamento do queijo, uma vez que não foi encontrada diferença significativa na qualidade da matéria-prima. Segundo Perry (2004), diversos fatores podem afetar a composição do queijo durante a obtenção da massa. Dentre eles, destaca-se o

tamanho do grão, a mexedura, o aquecimento, a prensagem e a salga, resultando em produtos únicos.

Teores médios de gordura e proteína total foram constados em queijos artesanais frescos, oriundos de Montes Claros, outra região do Norte de Minas com teores variando de 21 a 34 g/100 g e 16 a 30 g/100 g, respectivamente, em um total de 18 amostras coletadas em diferentes municípios (PINTO et al., 2016), diferenciando dos valores médios encontrados para o queijo PSIM e NSIM artesanal da Serra Geral. Quanto ao teor de gordura, considerando os critérios de classificação para queijos (BRASIL, 1996), o conteúdo de gordura no extrato seco, nos queijos de ambos os grupos de produtores, se encontra no intervalo de 45,0 a 59,9 g/100 g. Dessa forma, os queijos artesanais da Serra Geral fresco são enquadrados como gordos.

Não foi encontrada diferença significativa ($p < 0,05$) nos teores médios de cinzas entre os queijos do grupo PSIM e NSIM. Segundo Figueiredo (2018), o principal representante mineral do queijo é o cálcio, entretanto, o valor do parâmetro cinzas também é influenciado pelo efeito adicional dos resíduos minerais decorrentes da salga do queijo e tem origem externa ao leite.

Considerando a média dos sólidos totais, no queijo oriundo do PSIM, foi observado valor inferior quando comparado ao queijo do NSIM ($p < 0,05$), corroborando com os resultados de gordura que apresentou mesmo comportamento. Na legislação para QMA (IMA, 2021a) é exigido um valor máximo de 45,9 g/100 g de umidade para os queijos dessa categoria. Esse limite, no entanto, é adotado para queijos maturados, que apresentam teores de umidade menores, quando comparados a queijos frescos. Segundo o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Queijos (Brasil, 1996) os queijos frescos da Serra Geral (PSIM e NSIM) podem ser considerados como de alta umidade, massa branda ou macia. Castro et al. (2016), avaliando as características do QMA da região de Campo das Vertentes, não observaram influência do período do ano, seca e chuva, sobre os teores de sólidos totais e umidade do queijo fresco, entretanto, encontraram valores médios superiores ao preconizado pela legislação estadual (IMA, 2021a).

As condições de alta umidade e disponibilidade de nutrientes dos queijos artesanais da Serra Geral amostrados não demonstram restrições para o desenvolvimento microbiano podendo influenciar na quantidade de microrganismos indesejáveis e bactérias ácido-láticas.

Na tabela II.5, também são apresentados os resultados das análises microbiológicas do queijo artesanal da Serra Geral-MG. Foi observada diferença estatística ($p < 0,05$) quando comparados os grupos de produtores de queijos, nas contagens de *Escherichia coli* e *Staphylococcus* spp. estando o NSIM, com quantidades superiores.

Tabela II.5. Valores médios, medianas, coeficientes de variação (CV), valores mínimos e máximos de parâmetros físico-químicos e microbiológicos do queijo artesanal fresco da Serra Geral-MG

Parâmetros	PSIM				NSIM				p-valor
	Média/ Mediana	CV (%)	Mínimo	Máximo	Média/ Mediana	CV (%)	Mínimo	Máximo	
Físico-químicos									
pH**	5,23b	8,1	4,91	5,90	5,63a	7,9	5,00	6,16	<0,01
Acidez (g de ácido láctico/100 mL)**	0,25a	51,3	0,07	0,38	0,10b	50,6	0,04	0,16	0,02
Proteína (g/100 g)**	19,29a	7,11	17,53	21,09	18,18a	4,9	16,49	18,90	0,34
Gordura (g/100 g)**	23,71b	17,9	18,67	29,17	28,92a	13,9	25,75	35,50	0,03
Sólidos totais (g/100 g)**	51,00b	5,0	46,71	53,00	53,50a	9,7	43,31	55,47	0,04
Umidade (g/100 g)**	49,00a	4,8	47,00	53,29	46,50b	8,5	44,53	56,69	0,04
Cinzas (g/100 g)**	4,97a	12,7	3,79	5,51	4,59a	35,4	2,93	7,31	0,55
Microbiológicos									
Coliformes totais (UFC/mL)*	1,34 x 10 ⁶ a	176,4	5,70 x 10 ³	9,10 x 10 ⁷	4,60 x 10 ⁶ a	156,1	2,80 x 10 ⁶	9,50 x 10 ⁷	0,19
<i>Escherichia coli</i> (UFC/mL)*	3,50 x 10 ² a	175,4	<1,00 x 10 ²	3,02 x 10 ⁴	1,05 x 10 ² a	119,8	<1,00 x 10 ²	6,60 x 10 ⁵	0,06
<i>Staphylococcus</i> spp. (UFC/mL)*	8,70 x 10 ⁵ b	154,9	2,20 x 10 ⁴	1,36 x 10 ⁷	1,89 x 10 ⁷ a	99,9	2,70 x 10 ⁶	7,60 x 10 ⁷	0,01
<i>Staphylococcus</i> coag. positivo (UFC/mL)*	7,43 x 10 ⁵ a	157,5	2,20 x 10 ⁴	1,36 x 10 ⁷	1,27 x 10 ⁶ a	132,3	<1,00 x 10 ²	9,55 x 10 ⁶	0,77
Bactérias ácido-láticas (UFC/mL)*	2,12 x 10 ⁸ a	104,8	1,18 x 10 ⁸	1,40 x 10 ⁹	9,25 x 10 ⁷ a	138,3	5,30 x 10 ⁶	6,70 x 10 ⁸	0,13
Bolores e leveduras (UFC/mL)*	<1,00 x 10 ² a	244,6	<1,00 x 10 ²	3,90 x 10 ⁴	1,00 x 10 ² a	234,3	1,00 x 10 ²	1,86 x 10 ⁴	0,08

* Medianas ** Médias; PSIM = produtores que possuem inspeção municipal; NSIM = produtores não possuem inspeção municipal.

Médias seguidas de letras distintas na mesma linha, diferem o grupo de produtores pelo teste F ($p < 0,05$) ou medianas seguidas de letras minúsculas distintas na mesma linha, diferem entre o grupo de produtores pelo teste Wilcoxon Mann-Whitney ($p < 0,05$).

As contagens de coliformes totais nos dois grupos (PSIM e NSIM) estão acima do limite estabelecido para QMA ($5,0 \times 10^3$ UFC/mL) e para queijos de alta umidade ($1,0 \times 10^4$ UFC/mL) (IMA, 2021a). A partir dos resultados apresentados é possível definir a água, o leite cru, a bancada da queijaria e o pingo como fontes de contaminação do queijo artesanal da Serra Geral, além da possibilidade de outras fontes como, o contato com os manipuladores. Altas contagens dos microrganismos do grupo coliformes são responsáveis por um tipo de processo fermentativo, conhecido como estufamento precoce, por provocar, durante a enformagem e a etapa de salga, pequenas e numerosas olhaduras no queijo (EPAMIG, 2019).

Quanto a *Escherichia coli*, não foi encontrada diferença significativa ($p > 0,05$) entre os queijos oriundos dos grupos de produtores estudados, estando os valores medianos em ambos, de acordo com o preconizado pela legislação (IMA, 2021a). Pinto et al. (2016), avaliando os queijos artesanais frescos, da região de Montes Claros encontraram valores médios de $4,46 \times 10^4$ UFC/mL de *Escherichia coli*, estando apenas uma amostra, das 18 avaliadas, em conformidade com o exigido pela legislação. *Escherichia coli* faz parte da microbiota intestinal de animais de sangue quente, incluindo o homem. Sua presença no queijo pode indicar falhas no processo de higienização durante o processamento, presença de material de origem fecal sendo algumas linhagens patogênicas (CASTRO et al., 2016; METZ et al., 2020).

Contagens elevadas de *Staphylococcus* spp e *Staphylococcus* coagulase positivo foram constatadas nos queijos artesanais da Serra Geral-MG. Essa contaminação pode ser proveniente da matéria-prima leite, do pingo e das bancadas das queijarias, levando em consideração que o produto ainda pode estar sujeito a contaminação adicional oriunda da manipulação dos queijos realizada pelos produtores. De acordo com Borges et al. (2008), a presença de *Staphylococcus* nos alimentos é indicativo de deficiências de caráter higiênico na obtenção e processamento, especificamente nas operações que envolvem o contato manual.

A presença desse grupo microbiano tem sido frequente nos queijos artesanais frescos, apresentando também quantidades acima do permitido na legislação (BORELLI et al., 2006; SALES, 2015; CASTRO et al., 2016; PINTO et al., 2016; FIGUEIREDO, 2018). De acordo com o *Food and Drug Administration* (FDA, 1992), a produção de toxina estafilocócica passa a ser considerável quando a população deste microrganismo atinge níveis superiores a 10^5 UFC/g ou mL de alimento. Ainda, o número de pessoas afetadas, ou os surtos, são subnotificados devido a erros de diagnóstico e casos que não são relatados. A hospitalização é rara, mas tem sido observada em pessoas imunocomprometidas, principalmente idosos e crianças (SCALLAN et al., 2011).

Embora não haja padrão para bolores e leveduras em queijos artesanais na legislação, foram encontradas baixas contagens nos produtos analisados, não sendo observada diferença estatística ($p > 0,05$) entre os queijos oriundos do PSIM e NSIM, mesmo havendo particularidades no processo produtivo, com adição do pingo na elaboração do queijo pertencente ao grupo PSIM, com contagem de $1,79 \times 10^4$ UFC/mL para esses microrganismos. De fato, os bolores e leveduras são mais adaptados em ambientes com menor teor de umidade e elevada acidez, tendendo a se apresentarem em concentrações elevadas em queijos maturados (MEHLOMAKULU, 2011; BANJARA et al., 2015).

Não foi observada diferença estatística ($p > 0,05$) na contagem de BAL, quando comparado os queijos oriundos do PSIM e NSIM. As BAL foram encontradas com valores medianos na ordem de até 10^8 , indicando a superioridade na quantificação ao considerar os outros microrganismos estudados, sendo os possíveis responsáveis por conferir ao queijo sabor e textura característicos. O leite, o pingo (especificamente no queijo PSIM) e o contato com a bancada da queijaria contribuíram como fontes de BAL para o queijo artesanal da Serra Geral-MG. Segundo Rodríguez et al. (1995), é comum observar contagens elevadas de BAL nos queijos em função do efeito adicional das bactérias que estão presentes no leite, no sorofermento e ambiente, bem como, devido a multiplicação microbiana durante a coagulação do leite, durante a dessoragem e a própria retenção física dos microrganismos na massa.

Resultados semelhantes aos queijos artesanais da Serra Geral-MG, demonstrando as contagens de bactérias ácido-láticas em queijos, são relatados na literatura. Resende et al. (2011), comparando o QMA pertencentes as propriedades rurais não cadastradas e cadastradas pelo IMA na região da Serra da Canastra, encontraram contagens médias de BAL de $4,5 \times 10^7$ e $1,0 \times 10^8$ UFC/g, respectivamente, sem diferença significativa. Castro et al. (2016) avaliando o QMA fresco oriundo da região de Campo das Vertentes observaram contagem média de $5,1 \times 10^8$ UFC/g de BAL na época da seca.

Não foi detectada a presença de *Salmonella* spp. em nenhuma amostra de queijo artesanal da Serra Geral fresco. A não conformidade dos resultados, envolve a contagem elevada de coliformes totais, *Staphylococcus* spp. e *Staphylococcus* coagulase positivo, reforçando o risco microbiológico associado ao consumo do queijo artesanal fresco da Serra Geral-MG, considerando os dois grupos de produtores estudados.

3.6 Identificação proteômica das bactérias ácido-láticas

Não houve crescimento de bactérias ácido-láticas nas amostras de leite, na etapa de quantificação, referente a dois produtores do grupo PSIM e a dois produtores do grupo NSIM. Foram encaminhadas para análise proteômica, 19 colônias puras, sendo identificadas 18 ao nível de espécies e uma ao nível de gênero, *Lactobacillus*. Os morfotipos predominantes foram colônias brancas e translúcidas de tamanhos puntiforme, pequeno, médio e formato circular.

Em amostras do pingo, pertencentes ao PSIM, foi detectada semelhança entre os morfotipos isolados. Também predominaram colônias brancas e translúcidas de tamanho puntiforme, pequeno, médio e formato circular, oriundas de todas as propriedades do grupo, sendo identificadas 16 colônias ao nível de espécies.

Com relação aos suabes das bancadas, foi observada na etapa de quantificação, ausência de crescimento de BAL em quatro propriedades do grupo NSIM, ainda, foi detectada diferença entre os morfotipos isolados, que variaram de tamanho (pequeno, médio e grande), cor (branca e creme) e formas (lisa, circular e irregular). Foram encaminhadas para análise proteômica, 20 colônias puras, sendo identificadas 18 ao nível de espécies e uma ao nível de gênero, *Streptococcus*.

Considerando a identificação de BAL no queijo fresco, foram selecionadas 29 colônias puras para análise, sendo identificadas 21 ao nível de espécies e uma ao nível de gênero, *Streptococcus*.

As BAL identificadas nas matrizes pertencentes ao grupo PSIM são apresentadas na figura II.3. É possível verificar a predominância de *Lactococcus lactis* isolados do leite, do pingo, das bancadas e do queijo fresco. As funções metabólicas dos *Lactococcus* são desejáveis para a definição das características sensoriais do queijo. Isto ocorre, devido ao fato de estarem envolvidos na fermentação da lactose, com produção de ácido lático e outros ácidos orgânicos que contribuem para o aroma e sabor do produto. Estão naturalmente presentes ou adicionadas ao leite como culturas iniciadoras, *starters*, sendo constituintes em grande parte dos fermentos industriais, utilizados no processamento dos derivados lácteos (FOX et al., 2017). As propriedades do microrganismo em questão também são associadas, à ação bioconservadora como descrito por Yerlikaya (2019), que observou alta atividade inibitória de patógenos e deteriorantes por meio de bacteriocinas produzidas por linhagens de *L. lactis* ssp. *lactis*.

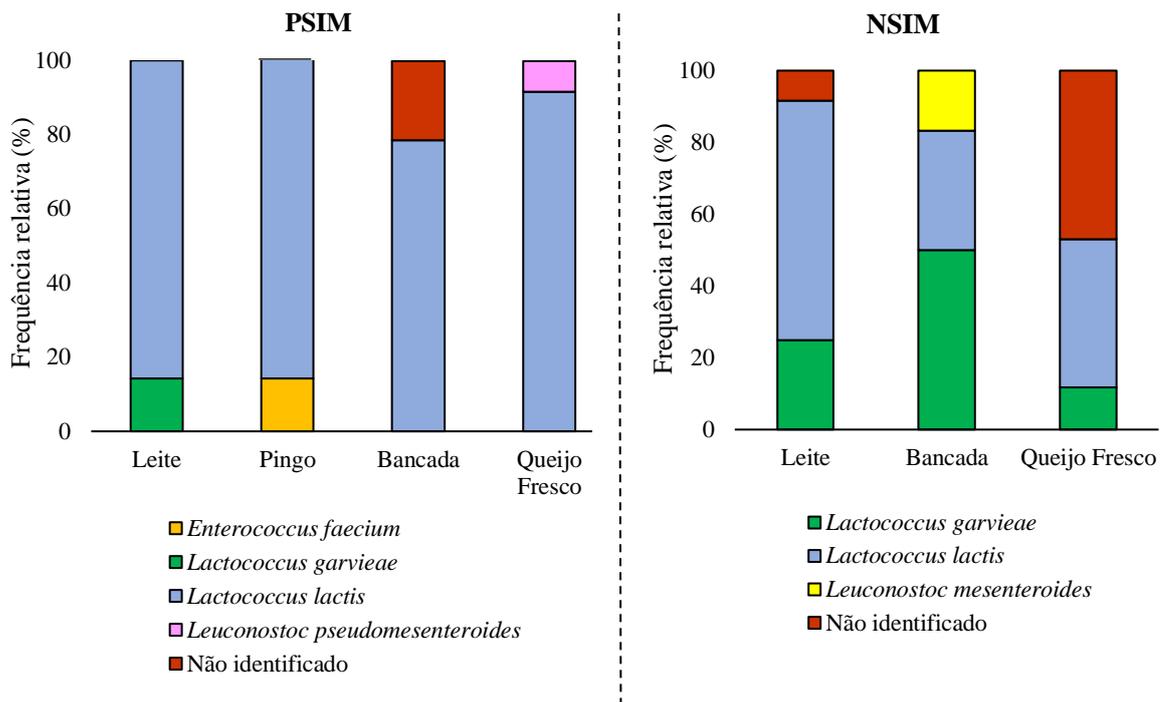


Figura II.3. Distribuição de frequência de bactérias ácido-láticas isoladas em diferentes matrizes pertencentes ao grupo de produtores que possuem o serviço de inspeção municipal (PSIM) e não possuem o serviço de inspeção municipal (NSIM).

É relatado que a matéria vegetal é o *habitat* natural de *L. lactis*, dessa forma, devido à alimentação animal, essa bactéria pode ter sido veiculada para o leite e, conseqüentemente, adaptada ao novo ambiente, sendo comum de ser encontrada em lácteos que não passaram por tratamento térmico (JAY, 2005; CAVANAGH et al., 2015). Até o presente momento, não foi encontrada na literatura pesquisada, a identificação dessa espécie microbiana associada à bancada de queijarias. Em contrapartida, a presença de *L. lactis* já havia sido identificada no pingo oriundo da região da Serra do Salitre e Canastra (LIMA et al., 2009; SALES, 2019). De qualquer forma, deve-se considerar que as superfícies das bancadas das queijarias, bem como o pingo e o leite são fontes consideráveis de *Lactococcus lactis* para o queijo artesanal da Serra Geral, predominando no produto fresco.

Lactococcus garvieae também foi identificado no leite. A utilização de *L. garvieae* em produtos lácteos proporciona a manifestação de características sensoriais desejáveis, a partir de propriedades tecnológicas semelhantes ao *L. lactis* com rápida formação de ácido lático e baixa atividade proteolítica no queijo (FERNANDEZ et al., 2010).

No pingo foi constatado *Enterococcus faecium*. A presença desse microrganismo no alimento é discutido sob duas vertentes, uma considerando sua contribuição para as características sensoriais do produto, principalmente pela atividade proteolítica e lipolítica

inerentes, sendo empregado, na produção industrial em alguns casos, como possíveis culturas adjuntas (RENYE et al., 2011). Ainda, por representar condições higiênicas inadequadas, durante a fabricação de alguns queijos artesanais, sendo uma evidência de possível contaminação fecal por compor a microbiota intestinal de alguns mamíferos e aves e, portanto, um risco para os consumidores, principalmente devido ao surgimento de cepas resistentes a antimicrobianos (LIMA et al., 2009; HAMMET et al., 2015).

Leuconostoc pseudomesenteroides foi identificado exclusivamente no queijo fresco com um frequência de 8,3%, não sendo constatado na literatura estudos que comprovem a presença desse microrganismo em queijos artesanais brasileiros. No queijo artesanal italiano Robiola di Roccaverano, embora não tenha sido detectado *Leuconostoc pseudomesenteroides* no produto fresco, a bactéria foi identificada no queijo com 15 dias de maturação (BIOLCATI et al., 2020).

Uma vez constatado o crescimento de microrganismos não pertencentes ao grupo de bactérias ácido-láticas, o perfil microbiológico do leite, pingo, bancada das queijarias e queijo fresco é apresentado na tabela II.6 para o grupo PSIM, a partir do isolamento realizado em placas contendo o meio de cultura MRS. A presença da espécie patogênica *Bacillus cereus* foi identificada no pingo de uma propriedade, demonstrando a resistência do microrganismo, por crescer em condições ambientais adversas a sua sobrevivência, como pH e concentração de NaCl. Seu habitat natural é o solo, mas estão amplamente distribuídos na natureza, podendo facilmente contaminar o leite e conseqüentemente o pingo. Segundo Andrade (2009), devido à capacidade de adesão às superfícies de aço inoxidável, mesmo após o processo de higienização, *Bacillus cereus* também deve ser considerado como formador de biofilme, tornando-se um sério problema para queijarias.

Tabela II.6. Frequência de identificação de microrganismos em leite, pingo, bancada das queijarias e queijo fresco, pertencentes aos produtores que possuem o serviço de inspeção municipal (PSIM)

Espécie	Frequência absoluta			
	Leite	Pingo	Bancada	Queijo Fresco
<i>Bacillus cereus</i>	0	1	0	0
<i>Enterococcus faecium</i>	0	1	0	0
<i>Kocuria kristinae</i>	0	0	2	0
<i>Lactococcus garvieae</i>	1	0	0	0
<i>Lactococcus lactis</i>	6	14	11	11
<i>Leuconostoc pseudomesenteroides</i>	0	0	0	1
Não identificado	0	0	1	0
Total	7	16	14	12

A espécie *Kocuria kristinae* foi identificada na bancada de duas propriedades, embora não tenha sido relatada constatação semelhante na literatura, outras pesquisas apontam para a presença do microrganismo no pingo da região da Canastra (SALES, 2019) e no QMA da Serra do Salitre (PERIM et al., 2017). *K. kristinae* é associada com infecções humanas, sendo algumas espécies desse gênero conhecidas como patógenos oportunistas (PURTY et al., 2013).

O perfil das BAL é apresentado na figura II.3 para o grupo NSIM. É possível verificar que *Lactococcus lactis* foi predominante no leite e queijo fresco com 66,7% e 41,2% de frequência, respectivamente, sendo encontrado também nas superfícies das bancadas das queijarias. Esse resultado reforça a tendência do comportamento do microrganismo, de se adaptarem em queijos que não passam pela maturação ou que não possuem essa etapa prolongada. Vale (2018) avaliando as contagens de *Lactococcus* spp. no QMA do Serro, identificou redução da quantidade do microrganismo a partir de 24 dias de maturação. *Lactococcus garvieae* foi identificado no leite e no queijo fresco, sendo a superfície da bancada das queijarias, ambiente que a espécie foi mais frequente.

Leuconostoc mesenteroides, por serem heterofermentativos, produzem, a partir do citrato, substâncias que são responsáveis pelas características sensoriais dos queijos (MCAULIFFE et al., 2019). Lima et al. (2009) constataram concentrações de $2,6 \times 10^2$ UFC/mL de *L. mesenteroides* no leite, com aumento significativo quando comparado aos valores médios de $1,5 \times 10^7$ UFC/mL encontrados no QMA da Serra do Salitre. No presente estudo, *L. mesenteroides* foi identificado apenas na bancada da queijaria com frequência de 16,7% não sendo detectado em nenhum momento no grupo PSIM.

Apesar de serem originados na mesma região, é notado no ambiente, na matéria-prima e no próprio queijo artesanal da Serra Geral um diferente perfil de bactérias ácido-láticas quando comparado os produtores do PSIM e NSIM. Provavelmente, o processo produtivo específico em cada grupo, por meio de elevação da temperatura da massa pela adição de água quente e utilização de pingo possa estabelecer condições para definir uma microbiota. Margalho et al. (2020), utilizando a técnica do MALDI ToF para avaliar a diversidade de BAL dos queijos artesanais brasileiros, atribuíram a predominância do gênero *Enterococcus* encontrado nos queijos de Marajó, Coalho e Manteiga à característica comum existente na etapa de cozimento da massa, considerando que o microrganismo apresenta elevada resistência térmica.

É possível observar que certas colônias de BAL encaminhadas para análise proteômica não foram identificadas ao nível de gênero e ao nível de espécie na bancada pertencente ao grupo PSIM e no leite e queijo fresco do NSIM (Figura III.3). A ausência de identificação de

microrganismos por meio da técnica de MALDI ToF pode ser explicada pela falta de informações no banco de dados no que se diz respeito à diversidade microbiana, bem como, a pureza da colônia e ainda a limitação que o método pode apresentar em distinguir espécies com características semelhantes (BOU et al., 2011).

Na tabela II.7 está descrito o perfil microbiológico do grupo NSIM, encontrado no leite, superfície da bancada das queijarias e queijo fresco a partir do isolamento realizado em placas contendo o meio de cultura MRS.

Tabela II.7. Frequência de identificação de microrganismos em leite, pingo, bancada das queijarias e queijos artesanais frescos, pertencentes aos produtores que não possuem o serviço de inspeção municipal (NSIM)

Espécie	Frequência absoluta		
	Leite	Bancada	Queijo Fresco
<i>Lactococcus garvieae</i>	3	3	2
<i>Lactococcus lactis</i>	8	2	7
<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	0	1	0
Não identificado	1	0	8
Total	12	6	17

Embora não tenha sido avaliada a abundância das BAL no leite, pingo, bancada das queijarias e queijos artesanais da Serra Geral, a identificação das espécies e gêneros são suficientes para caracterizar a microbiota regional possibilitando a valorização e o entendimento da diversidade encontrada em diferentes regiões.

4. CONCLUSÃO

A produção dos queijos artesanais da Serra Geral, MG, foi investigada pela primeira vez. A água que abastece a queijaria e o leite utilizado como matéria-prima na produção dos queijos sob inspeção municipal não apresentaram diferenças significativas, quando comparadas às propriedades que não possuem inspeção municipal. Contudo, a qualidade encontrada para essas matrizes não foi satisfatória. Constatou-se a presença de coliformes totais e coliformes termolerantes na água, sugerindo recontaminação após a etapa de cloração ou falha no tratamento, enquanto o leite demonstrou-se impróprio para o beneficiamento do queijo artesanal, com elevadas contagens de *Staphylococcus* coagulase positivo, estando em discordância com os valores limites estabelecidos na legislação.

As superfícies das bancadas constituíram uma fonte interessante de veiculação de bactérias ácido-láticas para o queijo artesanal. Entretanto, a condição microbiológica das bancadas não foi adequada, podendo também ser a responsável pela contaminação do queijo durante o processamento e armazenamento do produto. Contagens elevadas de *Staphylococcus* spp. foram encontradas, o que demonstra condições inadequadas de higienização nos locais.

Lactococcus lactis foi o microrganismo mais frequentemente encontrado no leite, bancada da queijaria, pingo (especificamente para os queijos oriundos de queijarias com inspeção) e queijo fresco.

Os queijos frescos da Serra Geral-MG foram enquadrados como gordos, de alta umidade, com massa branda ou macia para ambos os grupos de produtores. A não conformidade da qualidade microbiológica, se deveu às contagens elevadas de coliformes totais, *Staphylococcus* spp. e *Staphylococcus* coagulase positivo, reforçando o risco associado ao consumo do produto sem maturação.

CAPÍTULO III

CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS, MICROBIOLÓGICAS, NÍVEL DE PROTEÓLISE, PERFIL DE AMINOÁCIDOS E DE AMINAS BIOATIVAS LIVRES DO QUEIJO ARTESANAL DA SERRA GERAL-MG DURANTE A MATURAÇÃO

1. INTRODUÇÃO

A preocupação acerca da qualidade e segurança dos queijos artesanais tem sido motivo de vários estudos no contexto atual. Diversos fatores, são investigados com intuito de elucidar as características dos produtos para garantir a inocuidade aos consumidores, bem como, definir a influência de etapas do processamento sobre as propriedades dos queijos.

A maturação representa um estágio importante durante a produção dos queijos, desempenhando papel fundamental na alteração das propriedades físico-químicas e microbiológicas, sendo influenciada principalmente pela proteólise, que é essencial para o desenvolvimento da textura do produto, com contribuição direta para formação de vários compostos responsáveis pelo *flavour* (ARDO et al., 2017). Do ponto de vista microbiológico, uma complexa população microbiana é estabelecida durante a maturação, a partir de interações e sucessões ecológicas, podendo haver a formação de aminos bioativas.

As aminos bioativas são compostos naturais, produzidas a partir do metabolismo de aminoácidos. São formadas por processos bioquímicos e participam de funções metabólicas e fisiológicas essenciais nos organismos vivos, desempenhando diversas atividades biológicas (LENIS et al., 2017). Apesar de serem necessárias em diferentes funções no organismo humano e animal, em concentrações elevadas, as aminos biogênicas podem causar efeitos prejudiciais à saúde humana (BENKERROUM, 2016a).

No leite cru, geralmente, são encontrados baixos teores de aminos bioativas e nos queijos maturados, por outro lado, a concentração de aminos biogênicas tende a aumentar em função da proteólise. A formação e acúmulo de aminos no queijo pode estar relacionada a microrganismos descarboxilantes de aminoácidos (GLORIA, 2005; MOREIRA et al., 2018). A partir da hidrólise das proteínas, com liberação de aminoácidos, muitos gêneros bacterianos são capazes de produzir enzimas descarboxiladoras envolvidas na síntese das aminos, e as bactérias ácido-láticas são suas principais produtoras (ÖZOGUL e HAMED, 2018).

Considerando a necessidade de conhecimento associado às propriedades intrínsecas dos queijos e a metabólitos resultantes da atividade microbiana presente, com escassez de pesquisas,

especificamente dos queijos artesanais e ainda, ressaltando a importância da etapa de maturação e seus efeitos na modulação das características desse alimento, objetivou-se avaliar o queijo artesanal da Serra Geral-MG ao longo de 60 dias de maturação. Foram investigadas as características físico-químicas, microbiológicas, a intensidade da proteólise, o perfil e teores de aminoácidos livres, as aminas bioativas e a identificação de bactérias ácido-láticas.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Amostragem

As amostras de queijo foram obtidas de 12 produtores da região da Serra Geral, MG. Cada produtor, seis pertencentes ao grupo sob inspeção municipal (PSIM) e seis pertencentes ao grupo que não possui inspeção municipal (NSIM), forneceu duas peças inteiras de queijo (de aproximadamente 800 g) nos seguintes tempos: primeiro dia de produção, maturado com 14, 21 e 60 dias, pertencentes ao mesmo lote e produzidos inicialmente no mês de julho. A maturação foi realizada em prateleiras de madeiras, alocadas na própria propriedade, dentro das queijarias.

Considerando a influência do clima da região sobre as propriedades do queijo artesanal, foram coletadas informações do banco de dados do Instituto Nacional de Meteorologia (INMET), por meio da estação automática localizada no município de Janaúba, com a finalidade de conhecer as características climáticas regionais durante a execução da pesquisa. As variáveis estudadas foram: temperatura do ar (°C), umidade relativa (%), velocidade do vento (m/s) e precipitação pluviométrica (mm).

Nos queijos frescos e maturados ao longo de 60 dias, foram investigadas as características físico-químicas, microbiológicas a intensidade da proteólise, o perfil e os teores de aminoácidos livres e aminas bioativas. Além disto, foi realizada a identificação das bactérias ácido-láticas presentes. No leite, utilizado como matéria-prima para produção dos queijos, também foi analisado o perfil e teores de aminoácidos livres e aminas bioativas, sendo o produto previamente preparado a partir da liofilização utilizando equipamento modelo K105 (Liotop, São Carlos, São Paulo, Brasil). Até o momento da realização das análises, as amostras de leite e queijo foram acondicionadas e congeladas em freezer (-18 °C).

2.2 Reagentes e soluções

Para as análises cromatográficas, utilizou-se no preparo das soluções água ultrapura, obtida do Sistema Milli-Q Plus (Millipore Corp., Milford, MA, Estados Unidos) e reagentes de grau analítico com exceção do solvente acetonitrila que era de grau cromatográfico. As fases móveis foram filtradas em membrana com especificações de 0,22 µm de tamanho do poro e 47 mm de diâmetro (Millipore Corp., Milford, MA, Estados Unidos). Para derivação utilizou-se tampão borato e o derivante 6-aminoquinolil-N-hidroxi succinimidil carbamato (AQC) (Waters AccQ.Fluor®). Os padrões de aminoácidos utilizados foram: alanina (98%), asparagina (98%), monohidrocloreto de arginina (98%), ácido aspártico (98%), ácido glutâmico (99%), cistina cristalina (98%), fenilalanina (98%), glicina (99%), glutamina (99%), monohidrocloreto de histidina monohidratado (98%), isoleucina (98%), monohidrocloreto de lisina (98%), leucina (98%), metionina (98%), norvalina (99%), prolina (99%), serina (99%), tirosina (98%), treonina (98%), valina (98%), enquanto os padrões de aminas bioativas foram: cloridrato de beta-feniletilamina (98%), cloridrato de tiramina (98%), dicloridrato de cadaverina (98%), dicloridrato de histamina (99%), dicloridrato de putrescina (98%), serotonina creatinina sulfato mono hidratado (100%), sulfato de agmatina (97%), tetracloridrato de espermina (100%), tricloridrato de espermidina (98%) e triptamina (98%), todos padrões adquiridos da Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, Estados Unidos). O cloreto de amônio (100%) foi adquirido da Synth (Diadema, SP, Brasil).

Para as análises de proteólise, foram utilizados ácido bórico, ácido clorídrico, ácido sulfúrico, ácido tricloroacético, citrato de sódio, hidróxido de sódio, sulfato de cobre e sulfato de potássio.

2.3 Métodos de análises

2.3.1 Análises físico-químicas, microbiológicas e identificação de bactérias ácido-láticas do queijo

As metodologias utilizadas para as análises físico-químicas, microbiológicas e identificação de bactérias ácido-láticas por MALDI ToF do queijo, são as mesmas descritas no Capítulo II.

2.3.2 Índices de proteólise do queijo

Os índices de extensão e de profundidade da proteólise do queijo foram analisados no Laboratório de Análises de Alimentos da Universidade Estadual de Montes Claros, Campus Janaúba/MG. Os teores de nitrogênio total (NT), nitrogênio solúvel (NS) em pH 4,6 e nitrogênio solúvel em ácido tricloroacético (NSTCA) a 12 % (m/v) foram determinados pelo método de Kjeldahl, para obtenção dos índices de extensão de proteólise ($NS/NT \times 100$) e índices de profundidade de proteólise ($NSTCA/NT \times 100$) (PEREIRA et al., 2001).

2.3.3 Aminoácidos livres e aminas bioativas

As análises dos aminoácidos livres e das aminas bioativas foram realizadas no Laboratório de Bioquímica de Alimentos da Faculdade de Farmácia da UFMG, utilizando a técnica da cromatografia líquida de ultra eficiência (UPLCTM) e detecção ultravioleta a 249 nm (MOREIRA et al., 2017). Para a etapa de extração, as amostras de leite e queijo foram pesadas (1 g), adicionadas de ácido clorídrico 1 mol/L e agitadas em agitador orbital Tecnal® modelo TE-140 (250 rpm por 10 minutos) com três ciclos de centrifugação refrigerada ($11.180 \times g$ por 21 minutos a 4 °C) e filtragem em papel de filtro qualitativo, sendo adicionado no final da etapa o padrão interno L-norvalina, sendo o volume ajustado para 25 mL em balão volumétrico (MOREIRA et al., 2017).

Os extratos gerados foram neutralizados com hidróxido de sódio 1 mol/L, centrifugados ($16.000 \times g$, por 10 minutos a 4 °C) e derivados com 6 aminoquinolil-N-hidroxisuccinimidil carbamato (AQC) utilizando o kit Waters AccQ.Fluor®. A 5 µL de extrato neutralizado foram adicionados 35 µL de tampão borato AccQ.Fluor® e 10 µL de reagente AQC. Em seguida, o extrato foi aquecido a 55 °C por 10 minutos em banho-maria, completando a reação. As amostras neutralizadas e derivadas foram filtradas em filtros de seringa com 0,22 µm de poro (Whatman®, GE Healthcare, Maidstone, Inglaterra) para vial Total Recovery® Waters e analisadas por cromatografia líquida de ultra eficiência (MOREIRA et al., 2017).

Foi utilizado cromatógrafo Waters Acquity® Ultra Performance LC (UPLCTM) equipado com detector AcquityTM ultravioleta ajustável (UV) (Waters, Milford, Massachusetts, Estados Unidos). Para a separação utilizou-se coluna de fase reversa Acquity UPLCTM BEH C18 (2,1 × 50 mm, 1,7 µm). O volume de injeção de amostra foi 2 µL, a vazão da fase móvel foi de 1 mL/min e o comprimento de onda de detecção foi 249 nm a uma taxa de amostragem de 40

pontos/segundo. O software Waters Empower 2 foi utilizado para processamento dos dados. A identificação dos aminoácidos e aminas bioativas foi realizada por comparação entre o tempo de retenção dos picos encontrados nas amostras com o dos aminoácidos e aminas da solução padrão. A quantificação foi realizada por interpolação em curva analítica externa (MOREIRA et al., 2017).

2.4 Planejamento experimental e análise estatística

O delineamento experimental utilizado foi em blocos casualizados com arranjo em parcelas subdivididas. Os tratamentos consistiram em combinações de dois grupos de produtores (PSIM e NSIM) e quatro tempos de maturação do queijo (fresco, 14, 21 e 60 dias), constituindo os fatores como parcela e subparcela, respectivamente. Utilizou-se seis produtores, selecionados aleatoriamente, sendo estes considerados as repetições de cada grupo.

Os resultados foram testados quanto à sua distribuição normal pelo teste de Shapiro-Wilk e homocedasticidade das variâncias pelo teste de Bartlett. As variáveis que não atenderam as pressuposições estatísticas foram avaliadas por meio de testes não-paramétricos para comparação de medianas.

As variáveis não paramétricas foram comparadas entre os grupos de produtores por meio do teste de Wilcoxon Mann-Whitney, enquanto para as variáveis paramétricas, utilizou-se o teste F. Para comparação entre os tempos de maturação do queijo foi aplicado o teste de Friedman para as variáveis não paramétricas e o teste de Tukey para interpretação das variáveis paramétricas. Somente para as variáveis que apresentaram distribuição normal, realizou-se também a análise de regressão, sendo que para todas as conclusões foi considerado $\alpha = 0,05$. A análise de regressão foi avaliada para observar a equidistância entre os tempos de maturação.

A análise multivariada foi aplicada à matriz de dados para caracterização físico-química, microbiológica, aminas bioativas e aminoácidos livres do queijo, por meio da técnica de componentes principais (PCA, *Principal Components Analysis*) e análise de agrupamento hierárquico (HCA). Para a PCA, utilizou-se os dados dos ensaios entre os dois grupos de produtores de queijo (PSIM e NSIM) *versus* tempo de maturação (queijo fresco e maturado por 14, 21 e 60 dias) conduzida com padronização das variáveis usando matriz de correlação. Para a análise de similaridade, obteve-se a matriz pela distância Euclidiana, representada por dendograma obtido pelo método hierárquico *Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean* (UPGMA). A consistência do agrupamento foi verificada por meio do cálculo do

coeficiente de correlação cofenética (CCC). As análises estatísticas foram executadas no software PAST, versão 3.4 (Oslo, Noruega).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Características climáticas regional

A temperatura do ar, a umidade relativa, a velocidade do vento e a precipitação verificadas na região da Serra Geral-MG durante os meses de julho, agosto e setembro de 2019, quando as amostras foram coletadas, estão apresentados na tabela III.1. Pode-se observar pouca variação térmica durante os meses estudados, com temperaturas elevadas, mesmo na estação inverno, considerada a mais fria do ano. O cenário, com registro de chuva apenas no mês de setembro, não caracteriza apenas as condições típicas da época e sim uma realidade associada ao local onde se encontra a Serra Geral, inserida no polígono das secas, região caracterizada pelo déficit pluviométrico. Esta região integra a área de abrangência oficial do semiárido brasileiro com algumas características climáticas extremas, como: alta radiação solar e temperatura média anual e baixas taxas de precipitação e umidade relativa do ar (BRASIL, 2005; FERREIRA et al., 2019).

Tabela III.1. Dados meteorológicos* máximos, mínimos e médios da região da Serra Geral, Minas Gerais, Brasil, nos meses de julho, agosto e setembro de 2019

Meses	Temperatura do ar (°C)			Umidade relativa (%)			Velocidade do vento (m/s)	Precipitação (mm)
	Mín.	Média	Máx.	Mín.	Média	Máx.		
Julho	15,3	22,8	31,0	27,2	51,3	79,6	2,5	0,0
Agosto	16,9	24,3	31,8	28,8	50,5	78,6	2,5	0,0
Setembro	20,8	28,0	35,7	23,6	46,9	76,0	1,3	2,3

* Informações coletadas do banco de dados do Instituto Nacional de Meteorologia (INMET, 2019).

Pode-se observar que a variável umidade relativa apresentou valores com ampla variação nos meses avaliados. Comportamento semelhante foi observado por Figueiredo (2018) quando avaliou o mesmo parâmetro no período seco da região produtora de queijo artesanal Serra do Salitre, sendo observados valores máximos superiores a 80% e valores mínimos inferiores a 20% de umidade relativa do ar. Quando se define um ambiente ideal e controlado para acondicionamento do queijo após a elaboração, valores próximos de 85% de umidade ambiente são recomendados para a maioria das variedades (SOBRAL et al., 2017).

A velocidade média do vento, considerando os três meses de análises do queijo foi de 2,1 m/s. Segundo Bennamoun e Belhamri (2006), quanto maior for a velocidade do vento que circula no ambiente, maior será a perda de água por convecção e, conseqüentemente, maior a redução da temperatura do alimento, no caso do queijo, podendo interferir diretamente no tempo necessário para atingir as características satisfatórias da maturação. Deve-se ressaltar ainda que a velocidade do vento não só influencia a perda de água do queijo, mas também propaga partículas suspensas no ar, podendo dessa forma ser importante fonte de contaminação.

Os fatores climáticos exercem forte influência sobre a qualidade do queijo, proporcionando alteração nos constituintes químicos, principalmente nos teores de umidade e modulação na microbiota o que implica em variações nas características do produto, principalmente quando realizada a etapa de maturação.

3.2 Qualidade físico-química dos queijos ao longo de 60 dias de maturação

Os resultados das análises físico-químicas dos queijos artesanais produzidos na região da Serra Geral-MG ao longo do período de maturação de 60 dias estão apresentados na tabela III.2. Somente os parâmetros pH (PSIM e NSIM), acidez em ácido láctico (PSIM) e cinzas (PSIM) não foram afetados ao longo dos 60 dias de maturação ($p > 0,05$). Considerando a interação, foi detectado efeito dos grupos de produtores e tempo de maturação para os parâmetros acidez e composição do queijo como: teores de proteína, gordura, sólidos totais, umidade e cinzas.

Foi observada diferença significativa ($p < 0,05$) no pH, quando comparados os resultados queijos dos grupos PSIM e NSIM, em todos os tempos de maturação avaliados. Os queijos pertencentes ao PSIM estavam mais ácidos em resposta à utilização de pingo no queijo, por esse grupo de produtores, bem como, pelas etapas distintas durante o processamento. Conforme descrito na literatura, a adição de água quente após a formação da massa do queijo, que ocorre no grupo NSIM, pode promover a migração da lactose, incorporada no coágulo proteico, para o soro, alterando, possivelmente, o teor desse componente nos grãos da coalhada, resultando em um queijo com pH mais elevado (SPADOTI et al., 2003).

Tabela III.2. Valores médios, mínimos e máximos de parâmetros físico-químicos de queijos artesanais da Serra Geral-MG ao longo da maturação

Variável	Grupo de produtores	Tempos de maturação (dias)			
		Fresco	14	21	60
pH	PSIM	5,23 Ba (4,91 - 5,90)	5,05 Ba (4,77 - 5,28)	5,02 Ba (4,8 - 5,29)	5,04 Ba (5,01 - 5,11)
	NSIM	5,63 Aa (5,00 - 6,16)	5,39 Aa (5,19 - 5,62)	5,38 Aa (5,18 - 5,56)	5,44 Aa (5,27 - 5,72)
Acidez (g de ácido láctico/100 g)	PSIM	0,25 Aa (0,07 - 0,38)	0,29 Aa (0,22 - 0,33)	0,28 Aa (0,15 - 0,34)	0,32 Aa (0,18 - 0,46)
	NSIM	0,10 Bc (0,04 - 0,16)	0,20 Ab (0,16 - 0,29)	0,23 Aab (0,15 - 0,36)	0,31 Aa (0,25 - 0,37)
Proteína (g/100 g)	PSIM	19,29 Ac (17,53 - 21,09)	25,29 Ab (23,68 - 27,25)	23,35 Bb (19,47 - 26,92)	31,08 Ba (27,59 - 37,27)
	NSIM	18,18 Ac (16,49 - 18,90)	25,36 Ab (23,24 - 28,00)	26,20 Ab (23,85 - 28,42)	37,30 Aa (33,18 - 40,38)
Gordura (g/100 g)	PSIM	23,71 Bc (18,67 - 29,17)	38,00 Ab (24,50 - 44,50)	39,33 Bb (33,00 - 49,00)	44,50 Aa (39,00 - 50,00)
	NSIM	28,92 Ac (25,75 - 35,50)	36,67 Ab (32,00 - 44,00)	45,33 Ab (36,00 - 51,00)	42,42 Aa (38,50 - 49,00)
Sólidos totais (g/100 g)	PSIM	51,00 Ba (47,00 - 53,29)	58,34 Bb (56,38 - 59,23)	65,85 Ac (64,50 - 67,62)	77,73 Ad (75,99 - 79,96)
	NSIM	53,50 Aa (44,53 - 56,69)	65,99 Ab (64,47 - 68,09)	66,26 Ab (64,87 - 66,82)	75,43 Ac (72,83 - 76,91)
Umidade (g/100 g)	PSIM	49,00 Aa (46,71 - 53,00)	41,66 Ab (40,77 - 43,62)	34,15 Ac (32,38 - 35,49)	22,27 Ad (20,04 - 24,01)
	NSIM	46,50 Ba (43,31 - 55,47)	34,01 Bb (31,91 - 35,53)	33,74 Ab (33,18 - 35,13)	24,56 Ac (23,09 - 27,17)
Cinzas (g/100 g)	PSIM	4,97 Aa (3,79 - 5,51)	4,72 Ba (3,67 - 5,30)	5,10 Aa (4,26 - 6,54)	5,19 Aa (4,03 - 6,85)
	NSIM	4,59 Ab (2,93 - 7,31)	6,93 Aa (4,80 - 8,08)	5,74 Aa (4,45 - 6,75)	6,54 Aa (4,44 - 8,73)

PSIM = produtores que possuem inspeção municipal; NSIM = produtores não possuem inspeção municipal.

Médias seguidas de letras maiúsculas distintas na coluna, considerando a mesma variável, diferem o grupo de produtores pelo teste F ($p < 0,05$) e médias seguidas de letras minúsculas distintas na mesma linha, diferem o tempo de maturação pelo teste Tukey ($p < 0,05$).

Deve-se considerar que a acidez pronunciada durante a formação da massa está associada à ação das bactérias sobre lactose. Por ser hidrossolúvel, parte desse componente é eliminado no soro, no entanto, uma quantidade permanece no queijo que está sendo formado, servindo de substrato para as BAL, durante a glicólise, dando origem a ácidos orgânicos, que acidificam o meio (FOX et al., 2000; MCSWEENEY, 2004).

Da mesma forma que o constatado no presente trabalho, Pinto et al. (2011) não encontraram diferença estatística ($p > 0,05$) no pH do queijo Minas artesanal do Serro durante a maturação por 60 dias. Entretanto, o efeito da maturação sobre o pH foi uma tendência relatada por outros autores, principalmente no tempo de maturação final, quando comparado ao queijo fresco (SALES, 2015; FIGUEIREDO, 2018; SOARES et al., 2018). Ao investigar qual modelo matemático explicaria o comportamento dos dados de pH, a regressão quadrática foi a que melhor representou o fenômeno (Figura III.1).

Quanto ao parâmetro da acidez em ácido láctico, foi observado nos queijos pertencentes ao grupo NSIM um aumento da acidez com 14 e 21 dias de maturação, acentuando-se com 60 dias, e ainda, diferindo do queijo fresco oriundo do PSIM, que apresentou-se mais ácido, provavelmente provocado pelos distintos perfis e concentração microbiana, bem como pelas diferentes características dos queijos (PSIM e NSIM). Deve-se ressaltar que apesar dos testes informarem sobre o mesmo fenômeno, houve uma maior sensibilidade na análise da acidez titulável, quando comparada a análise do pH, permitindo identificar a influência da maturação sobre os queijos NSIM. Considerando a análise de regressão, o efeito linear crescente foi significativo ($p < 0,05$) definindo o fenômeno que demonstra o comportamento da variável.

A redução da acidez durante a maturação de queijo também pode ser detectada em determinadas situações. Segundo Pagthinathan e Nafees (2015), os compostos formados durante a proteólise, como as aminas bioativas, podem contribuir para a elevação de pH do queijo durante a maturação. E, ainda a estabilidade do pH em valores mais altos, tendendo ao alcalino, pode ser justificada pela presença de bolores e leveduras que utilizam o ácido láctico para ganho energético.

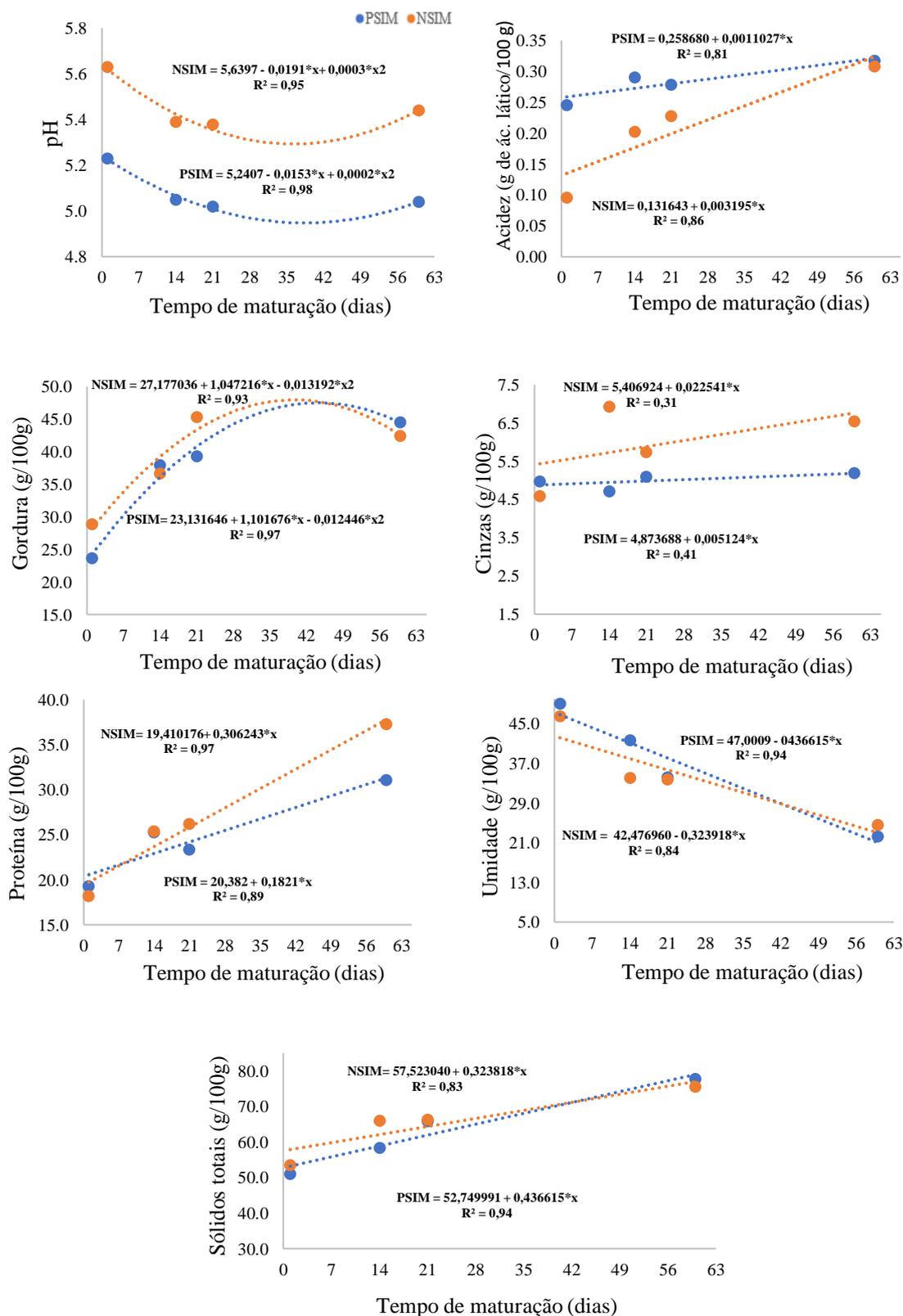


Figura III.1. Resultados de análises de pH, acidez, gordura, cinzas, proteína, umidade e sólidos totais dos queijos artesanais da Serra Geral-MG ao longo da maturação de 60 dias.

Quanto à composição dos queijos, é possível observar que ao longo da maturação, ocorre perda de umidade e, conseqüentemente, concentração dos constituintes. Nota-se o aumento do teor de gordura ao longo dos 60 dias de maturação nos queijos oriundos de ambos os grupos de produtores. Foi constatada diferença significativa ($p < 0,05$) entre PSIM e NSIM quando observado o queijo fresco e maturado com 21 dias, estando o PSIM com menores teores de gordura. Esse fato pode ser justificado pela ocorrência de uma possível lipólise do queijo a partir de enzimas endógenas e microbianas. Esta constatação sugere a realização de estudos específicos que avaliem a atividade lipolítica nos queijos artesanais da Serra Geral-MG durante a maturação. Adicionalmente, pela análise de regressão, a gordura teve o comportamento explicado pelo efeito quadrático (Figura III.1). Dados obtidos em pesquisas realizadas com queijos de outras regiões do estado de Minas Gerais também demonstraram o mesmo comportamento, com tendência de concentração da gordura ao longo da maturação (SALES, 2015; FIGUEIREDO, 2018; SOARES et al., 2018).

Considerando os critérios de classificação para queijos (BRASIL, 1996), quando o conteúdo de gordura no extrato seco se encontra no intervalo de 45,0 a 59,9%, os queijos são enquadrados como gordos. Dessa forma, os queijos artesanais da Serra Geral-MG podem ser definidos nessa categoria, em todos os tempos de maturação avaliados.

O conteúdo da proteína foi influenciado pelo tempo de maturação e a equação linear crescente foi utilizada para explicar o comportamento da variável. No grupo PSIM, nota-se que com 21 e 60 dias de maturação dos queijos artesanais da Serra Geral, os valores médios demonstraram-se inferiores ao NSIM, provavelmente provocada pela diferença na produção. Os maiores teores de proteína encontrados nos queijos NSIM, podem ser explicados pela utilização de água quente diretamente na massa, etapa incorporada no fluxograma de produção do queijo em questão, que provavelmente proporcionou uma maior aglomeração de grãos no momento da coleta da coalhada, elevando os teores proteicos no queijo e reduzindo as perdas no soro. Augusto (2003), avaliando o efeito do aquecimento da massa sobre a composição do queijo prato, observou influência do calor no aumento significativo na proteína total e redução da umidade. Esse mesmo efeito pode ser utilizado para justificar os maiores teores médios de extrato seco total e conseqüente menor teor de umidade no grupo NSIM observados nos queijos frescos e maturados com 14 dias.

Houve influência da maturação sobre o teor de umidade do queijo (PSIM e NSIM), conforme dados da tabela III.2, sendo o fenômeno também ilustrado na figura

III.1. A perda de água do queijo é um acontecimento esperado, quando o produto está acondicionado em ambientes com condições climáticas não controladas e sem embalagem. No entanto, os valores que representam a composição do produto proporcionam classificá-los de acordo com as definições que constam na legislação. Dessa forma, foi possível enquadrar o queijo artesanal da Serra Geral fresco (PSIM e NSIM) na categoria de alta umidade, com 14 dias, especificamente no grupo PSIM como queijo de média umidade (massa semidura) e 14 dias no grupo NSIM, bem como os queijos de ambos os grupos com 21 e 60 dias de maturação, como queijo de baixa umidade e massa dura (BRASIL, 1996).

Considerando os teores de sólidos totais, no queijo fresco e maturado com 14 dias, oriundos do PSIM foram observados valores inferiores, quando comparado aos queijos do NSIM ($p < 0,05$) como esperado, já que os teores de umidade se apresentaram inverso. Ainda deve-se considerar que no NSIM, grupo que utiliza água quente sobre a massa, o queijo pode apresentar-se propício à desidratação, com a coalhada alcançando temperatura elevada em resposta ao calor recebido (AUGUSTO, 2003). Conforme indicado na figura III.1, o aumento gradativo dos teores de sólidos totais está relacionado com a perda de umidade dos queijos, contribuindo para a concentração dos sólidos ao longo do período avaliado. Pelo ajuste ao modelo linear crescente, é possível estimar o aumento de sólidos de 0,32% no NSIM e 0,44% no PSIM a cada dia de maturação. O extrato seco total do queijo é representado pelos conteúdos de proteína, gordura, lactose e minerais, enquanto a umidade retrata principalmente o nível de sinerese durante o processamento e maturação.

Com relação aos teores de cinzas, ao longo da maturação (Figura III.1), embora o modelo de regressão linear seja o mais representativo, com coeficiente de regressão significativo pelo teste t, encontrou-se um coeficiente de determinação muito baixo (0,41 no PSIM e 0,31 no NSIM), em ambos os grupos de produtores, que não permite representar adequadamente o fenômeno observado. De acordo com a tabela III.2, é possível observar influência da maturação no queijo pertencente ao NSIM, diferindo do queijo fresco, por apresentar teor inferior dos queijos maturados (14, 21 e 60 dias). Segundo Figueiredo (2018), o principal representante mineral do queijo é o cálcio, entretanto, o valor do parâmetro cinzas também é influenciado pelo efeito adicional dos resíduos minerais decorrentes da salga do queijo e tem origem externa ao leite. Vale et al. (2018) não observaram efeito da maturação durante 31 dias em ambiente controlado sobre as concentrações de cinzas no QMA do Serro.

A composição do queijo e, conseqüentemente, suas propriedades refletem fortemente a qualidade da matéria prima, a técnica de fabricação empregada, a condição ambiental que envolve o produto, além da microbiota presente durante a maturação. No presente estudo, é notada, uma influência significativa do processo produtivo sobre as características do queijo, uma vez que não foi observada diferença na qualidade do leite empregado na elaboração (Capítulo II).

3.3 Qualidade microbiológica dos queijos ao longo de 60 dias de maturação

As características microbiológicas dos queijos artesanais produzidos na região da Serra Geral-MG estão descritas na tabela III.3. Foi constatado efeito da maturação sobre todas as contagens microbianas ($p < 0,05$). O comportamento e a linha de tendência das variáveis microbiológicas do queijo ao longo de 60 dias de maturação, também pode ser observada na figura III.2. Embora não existam padrões legais específicos que regulamentam os queijos artesanais mineiros, limites estabelecidos na legislação para QMA e queijos em geral (IMA, 2021a) foram utilizados como critério de qualidade.

As contagens de coliformes totais nos dois grupos (PSIM e NSIM) foram elevadas no queijo fresco. A partir dos resultados apresentados anteriormente (Capítulo II), é possível definir a água, o leite cru, a bancada da queijaria e, principalmente, o pingo como fontes de contaminação do queijo artesanal, além da possibilidade de outros fatores, como o contato com os manipuladores. A partir de 14 dias de maturação foi observada redução das contagens de coliformes totais e no caso do grupo PSIM atingindo o padrão exigido para queijo de baixa umidade ($< 36\%$) e, também, QMA com 21 dias de maturação. No entanto, no NSIM não foi possível alcançar limites seguros para a saúde do consumidor durante todo o período de 60 dias. Cangussu (2018), avaliando o comportamento microbiológico nos queijos artesanais frescos e maturados (15, 30, 45 e 60 dias) produzidos na Serra Geral-MG, observou que, com 15 dias de maturação, em temperatura ambiente (25 a 30 °C), a contagem de coliformes totais se enquadrava nos padrões legais.

Tabela III.3. Valores medianos, mínimos e máximos de parâmetros microbiológicos dos queijos artesanais da Serra Geral-MG ao longo da maturação

Variável (UFC/g)	Grupo de produtores	Tempos de maturação (dias)			
		Fresco	14	21	60
Coliformes totais	PSIM	1,34 x 10 ⁷ Aa (5,70 x 10 ³ - 9,10 x 10 ⁷)	3,95 x 10 ³ Ab (<1,00 x 10 ² - 7,40 x 10 ⁷)	5,75 x 10 ² Bb (<1,00 x 10 ² - 2,40 x 10 ⁵)	5,50 x 10 ¹ Bc (<1,00 x 10 ² - 1,10 x 10 ⁴)
	NSIM	4,60 x 10 ⁶ Aa (2,80 x 10 ⁶ - 9,50 x 10 ⁷)	1,22 x 10 ⁶ Ab (5,60 x 10 ³ - 8,40 x 10 ⁷)	2,50 x 10 ⁵ Ac (4,40 x 10 ³ - 1,13 x 10 ⁶)	1,51 x 10 ⁴ Ad (<1,00 x 10 ² - 1,51 x 10 ⁴)
<i>Escherichia coli</i>	PSIM	3,50 x 10 ² Bb (<1,00 x 10 ² - 3,02 x 10 ⁴)	1,00 x 10 ² Bc (<1,00 x 10 ² - 3,00 x 10 ⁴)	4,50 x 10 ² Ba (<1,00 x 10 ² - 2,40 x 10 ⁵)	<1,00 x 10 ² Bd (<1,00 x 10 ² - 1,00 x 10 ²)
	NSIM	1,05 x 10 ⁵ Aa (<1,00 x 10 ² - 6,60 x 10 ⁵)	1,90 x 10 ⁵ Aa (6,00 x 10 ² - 2,60 x 10 ⁷)	1,30 x 10 ⁵ Aa (<1,00 x 10 ² - 3,40 x 10 ⁵)	1,51 x 10 ⁴ Ab (<1,00 x 10 ² - 1,51 x 10 ⁴)
<i>Staphylococcus spp</i>	PSIM	8,70 x 10 ⁵ Bb (2,20 x 10 ⁴ - 1,36 x 10 ⁷)	5,60 x 10 ⁷ Aa (1,74 x 10 ⁷ - 2,01 x 10 ⁹)	6,30 x 10 ⁷ Aa (1,01 x 10 ⁷ - 1,76 x 10 ⁸)	2,37 x 10 ⁷ Aa (1,10 x 10 ⁶ - 2,23 x 10 ⁸)
	NSIM	1,89 x 10 ⁷ Ab (2,70 x 10 ⁶ - 7,6 x 10 ⁷)	1,13 x 10 ⁸ Aa (2,80 x 10 ⁷ - 1,07 x 10 ⁹)	3,50 x 10 ⁷ Ab (1,81 x 10 ⁷ - 2,10 x 10 ⁸)	3,36 x 10 ⁶ Ac (1,23 x 10 ⁶ - 6,60 x 10 ⁶)
<i>Staphylococcus coagulase positivo</i>	PSIM	7,43 x 10 ⁵ Aa (2,20 x 10 ⁴ - 1,36 x 10 ⁷)	1,70 x 10 ⁷ Aa (<1,00 x 10 ² - 9,96 x 10 ⁸)	<1,00 x 10 ² Ab (<1,00 x 10 ²)	<1,00 x 10 ² Ab (<1,00 x 10 ²)
	NSIM	1,27 x 10 ⁶ Aa (<1,00 x 10 ² - 9,55 x 10 ⁶)	1,71 x 10 ⁶ Aa (<1,00 x 10 ² - 2,14 x 10 ⁷)	<1,00 x 10 ² Ab (<1,00 x 10 ² - 3,50 x 10 ⁷)	<1,00 x 10 ² Ab (<1,00 x 10 ²)
Bactérias ácido-láticas	PSIM	2,12 x 10 ⁸ Aa (1,18 x 10 ⁸ - 1,40 x 10 ⁹)	2,10 x 10 ⁷ Ab (5,10 x 10 ⁶ - 3,80 x 10 ⁸)	1,07 x 10 ⁸ Aab (1,11 x 10 ⁷ - 2,36 x 10 ⁸)	1,16 x 10 ⁶ Ac (<1,00 x 10 ² - 1,40 x 10 ⁷)
	NSIM	9,25 x 10 ⁷ Aa (5,30 x 10 ⁶ - 6,70 x 10 ⁸)	1,83 x 10 ⁸ Aa (1,56 x 10 ⁸ - 1,20 x 10 ⁹)	2,71 x 10 ⁷ Aa (2,85 x 10 ⁶ - 3,70 x 10 ⁸)	1,41 x 10 ⁷ Ab (1,40 x 10 ⁴ - 9,60 x 10 ⁶)
Bolor e levedura	PSIM	<1,00 x 10 ² Ac (<1,00 x 10 ² - 3,90 x 10 ⁴)	1,31 x 10 ⁶ Ba (3,40 x 10 ⁵ - 3,10 x 10 ⁷)	2,56 x 10 ⁶ Aa (<1,00 x 10 ² - 6,30 x 10 ⁶)	2,10 x 10 ⁵ Ab (<1,00 x 10 ² - 1,54 x 10 ⁷)
	NSIM	1,00 x 10 ² Ac (1,00 x 10 ² - 1,86 x 10 ⁴)	9,10 x 10 ⁷ Aa (2,00 x 10 ⁶ - 9,60 x 10 ⁸)	1,04 x 10 ⁶ Ab (<1,00 x 10 ² - 9,10 x 10 ⁶)	1,95 x 10 ⁵ Ab (<1,00 x 10 ² - 6,20 x 10 ⁶)

PSIM = produtores que possuem inspeção municipal; NSIM = produtores não possuem inspeção municipal; medianas seguidas de letras maiúsculas distintas na coluna, considerando a mesma variável, diferem o grupo de produtores pelo teste Wilcoxon Mann-Whitney (p<0,05) e letras minúsculas na mesma linha, diferem o tempo de maturação pelo teste Friedman (p<0,05).

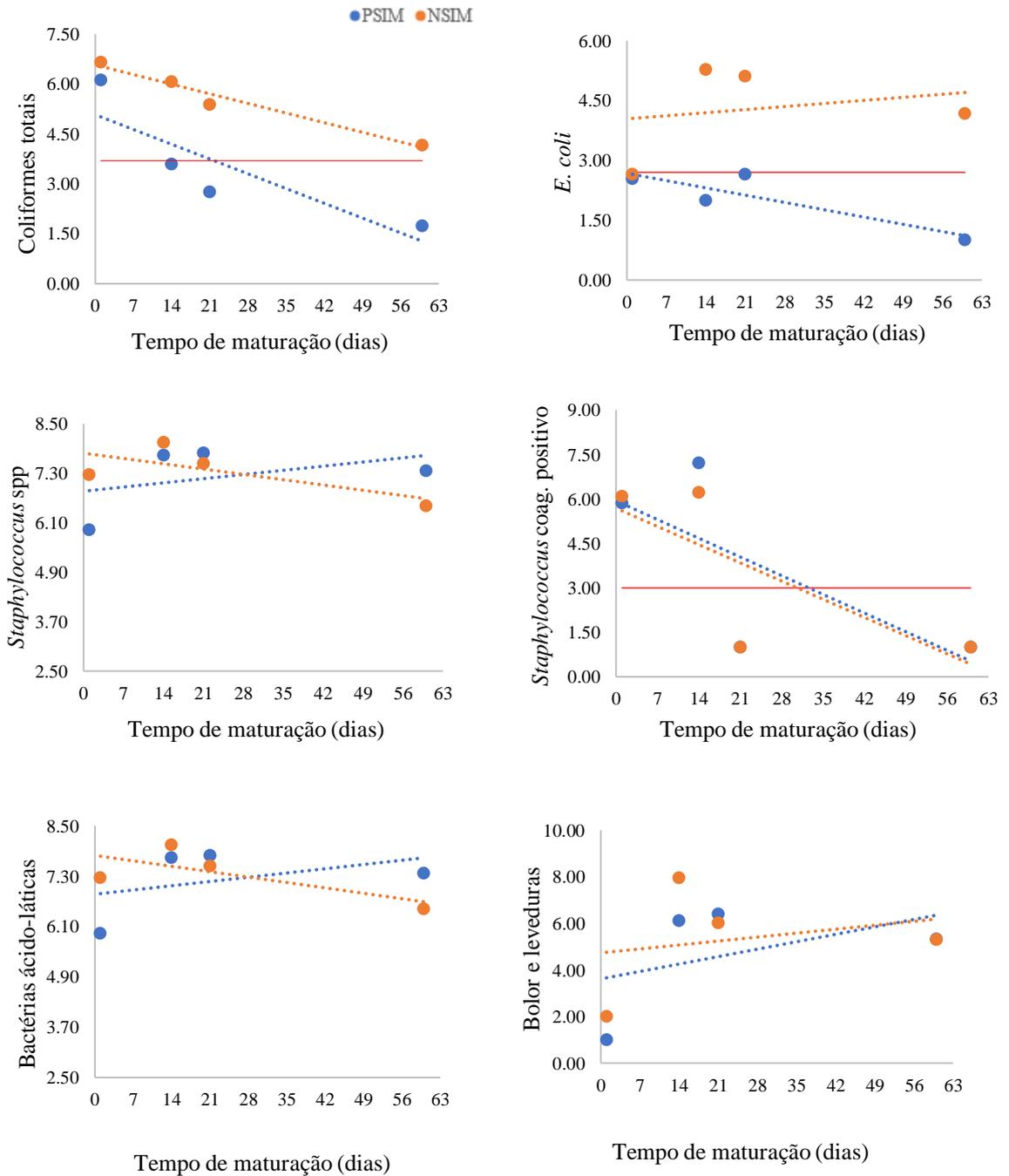


Figura III.2. Comportamento e linha de tendência dos parâmetros microbiológicos (log UFC/g) dos queijos artesanais da Serra Geral-MG maturados ao longo de 60 dias. As linhas vermelhas contínuas indicam os limites microbiológicos exigidos pela legislação (IMA, 2021a). PSIM = produtores que possuem inspeção municipal; NSIM = produtores que não possuem inspeção municipal.

Ainda, neste mesmo tempo, a contagem de *S. aureus* foi elevada, atingindo os requisitos de segurança microbiológica apenas com 60 dias.

Considerando *E. coli*, nota-se no grupo PSIM, que o queijo fresco apresentou contagem inferior quando comparado com o tempo de 14 dias de maturação, com, no entanto, valor mediano superior no tempo de 21 dias. Essa oscilação nas contagens da bactéria sugere que o produto tenha sido contaminado durante a maturação, sendo uma falha recorrente, observada na quantificação também de outros microrganismos ao longo do tempo estudado. O contágio pode estar relacionado com diversos pontos, como: ausência de local específico para maturação em algumas propriedades, com prateleiras de madeiras alocadas na própria área de produção; etapa de viragem do queijo, realizada sem os devidos cuidados pelo produtor; e lavagem do queijo utilizando água sem o devido tratamento, ocasionando diversos tipos de contaminação cruzada.

Contudo, com 21 dias o grupo PSIM apresentou-se suficiente no atendimento do padrão exigido para *E. coli*, enquanto o NSIM permaneceu com valores que extrapolam os limites exigidos. Deve-se ressaltar ainda, que o queijo oriundo do NSIM, teve contagens superiores ao PSIM, na quantificação dos coliformes totais e *E. coli* em todos os tempos de maturação. No queijo recém processado o número de coliformes é elevado em função do efeito adicional da provável contaminação existente no ambiente, na matéria-prima e pingo, bem como, na manipulação que ocorre durante a produção. Entretanto, segundo Metz et al. (2020), a maturação provoca um declínio das contagens de certos grupos microbianos, por afetar consideravelmente o desenvolvimento e a sobrevivência bacteriana. O efeito da maturação sobre a redução das contagens de coliformes totais e *E. coli* foi reportado por diversos autores, incluindo o QMA da Serra da Canastra com 22 dias de maturação (CAMPOS, 2019), o QMA do Triângulo Mineiro maturado por 26 dias (SOARES et al., 2018), o QMA da Serra do Salitre com 63 dias de maturação (FIGUEIREDO, 2018), o QMA de Araxá com 57 dias de maturação (SALES, 2015) e também em outros queijos artesanais como o Serrano, durante 60 dias de maturação (SOARES et al., 2003).

Segundo Özogul e Hamed (2018), a tendência de redução na contagem de alguns grupos de microrganismos durante a maturação do queijo se deve às características estabelecidas ao longo da etapa como, diminuição do potencial redutor, do pH, da atividade de água, alta concentração salina, produção de ácido orgânicos, produção de compostos inibidores e ainda a competição por nutrientes com as BAL.

O tempo de maturação influenciou a contagem de *Staphylococcus* spp. nos queijos dos grupos de produtores estudados. No entanto, é possível observar que a quantificação bacteriana do gênero foi elevada e a redução que ocorreu, não provocou a eliminação do microrganismo. Esse mesmo comportamento foi constatado em outros trabalhos (SALES, 2015; CASTRO et al., 2016; FIGUEIREDO, 2018), evidenciando a resistência de grupos microbianos às condições adversas que são estabelecidas no queijo ao longo da maturação, bem como uma possível recontaminação.

As espécies que são coagulase positivos produzem enterotoxinas, no entanto, espécies como *S. epidermidis* e *S. saprophyticus*, que são coagulase negativos, são também produtoras e já foram encontradas em alimentos, incluindo queijos artesanais. Segundo Andrade et al. (2019), a alta frequência de cepas estafilocócicas coagulase negativo detectadas em amostras de queijo artesanal, sugere a necessidade de reavaliar os padrões microbiológicos estabelecido pela legislação brasileira para mudança que exija apenas a cobrança de *Staphylococcus* spp.

Durante um tempo, a capacidade de produzir a enzima coagulase e enterotoxinas foi associada apenas ao *Staphylococcus aureus*, fazendo que essa fosse a espécie de coagulase positivo mais pesquisada. No entanto, os testes utilizados para diferenciar *S. aureus* das outras espécies do gênero não são específicos para esse microrganismo, fazendo com que *S. intermedius*, *S. delphini* e *S. hyicus* também envolvidos em surtos de intoxicação alimentar, fossem contabilizados como *S. aureus*. Assim, a legislação brasileira, no âmbito da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) e Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA) passou a avaliar a presença de *Staphylococcus* coagulase positivo (SILVA et al., 2015). Na avaliação das quantidades de *Staphylococcus* coagulase positivo nos queijos artesanais da Serra Geral, foi possível observar influência da maturação no PSIM e NSIM, com redução significativa ($p < 0,05$) das contagens, alcançando valores inferiores a $1,0 \times 10^2$ UFC/mL com 21 dias, em ambos os grupos, atingindo os valores limites, exigidos pela legislação. Entretanto, deve-se considerar que os valores encontrados no início da maturação (1 e 14 dias) são elevados. Sugere-se que a contaminação seja proveniente da matéria prima leite, do pingo e das bancadas das queijarias, levando em consideração que o produto ainda pode estar sujeito a contaminação adicional oriunda da manipulação dos queijos realizada pelos produtores. Como *Staphylococcus* spp. são comumente encontrados nas narinas, garganta, axilas e pele de portadores humanos, estudos epidemiológicos apontam os manipuladores como a principal fonte de contaminação do alimento (SAKR et al., 2018; TALLENT et al., 2019).

Considerando as bactérias ácido-láticas, foi observada influência da maturação ($p < 0,05$) sobre as quantidades dos microrganismos nos dois grupos de produtores (PSIM e NSIM), que com 60 dias atingiram as menores quantidades no período avaliado (Tabela III.3). Luiz et al. (2017) pesquisando o queijo QMA de Araxá, encontraram valores variando de $3,9 \times 10^8$ UFC/g a $6,3 \times 10^6$ UFC/g no primeiro dia e 57 dias de maturação, respectivamente, também no período seco. Na região da Serra do Salitre, Figueiredo (2018) encontrou contagens de BAL variando de $5,45 \times 10^7$ e $2,20 \times 10^6$ no início e com 63 dias de maturação, respectivamente.

Segundo Jonnala et al. (2018), a presença das bactérias ácido-láticas é indispensável para o desenvolvimento das características específicas dos queijos artesanais, conferindo ao produto sabor, aroma e textura. Além da alteração das características sensoriais, determinadas BAL promovem a conservação dos queijos inibindo a microbiota deteriorante e patogênica. Cabral et al. (2016) observaram ação antagonista das BAL isoladas do queijo coalho artesanal, inibindo 90% do crescimento de patógenos testados (*Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* e *Staphylococcus aureus*). Costa et al. (2018) comprovaram o efeito antagônico de BAL sobre *Listeria monocytogenes* no queijo Minas frescal.

Quanto aos bolores e leveduras, foi observada diferença significativa ($p < 0,05$) ao longo do tempo de maturação nos dois grupos de produtores estudados (Tabela III.3). A contagem no queijo fresco foi menor, atingindo os maiores valores no PSIM aos 14 e 21 dias e no NSIM aos 14 dias de maturação. É válido destacar que, no momento inicial, as contagens foram baixas, minimizando a possibilidade que os fungos fossem provenientes do pingo e leite, sugerindo assim, principalmente uma contaminação ambiental.

A oscilação nas contagens de bolores e leveduras, provavelmente, está relacionada às condições intrínsecas do queijo que são definidas ao longo da etapa de maturação. Dessa forma, uma melhor compreensão do impacto desses parâmetros sobre o crescimento do microrganismo se faz necessária para entender de forma específica o comportamento microbiano. Segundo Cardoso et al. (2015), existem poucos estudos científicos, principalmente se tratando de queijo artesanal, que definem a maneira pela qual a diversidade e a concentração desses microrganismos, podem mudar em função de variações nas características do queijo.

Sales (2015) observou aumento das contagens de bolores e leveduras com 7 e 14 dias de maturação no QMA de Araxá e, posteriormente, uma redução no tempo de 57 dias, atingindo contagens de 10^5 . Cardoso et al. (2015) também descreveram aumento da quantidade de leveduras a partir de 15 dias e sua estabilidade até 60 dias de maturação do QMA do Serro.

Apesar de se observar uma tendência desejável no crescimento de fungos filamentosos nas superfícies dos queijos artesanais devido à contribuição nas propriedades sensoriais, as legislações brasileiras para queijos artesanais não contemplam um padrão específico. São definidos limites no regulamento técnico geral de queijos, apenas para os produtos de muita alta umidade (>55%) que devem atingir valores máximos de $5,0 \times 10^3$ UFC/g. O fungo não é agente patogênico veiculado por alimentos, mas algumas espécies são produtoras de micotoxinas genotóxicas para o homem comprometendo a qualidade e inocuidade do produto (BENKERROUM, 2016b).

A presença de *Salmonella* spp. foi detectada no queijo de dois produtores pertencentes ao grupo PSIM com 14 dias de maturação, no entanto, com 21 e 60 dias não foi mais constatada a presença do microrganismo. Por se tratar de um teste qualitativo, de forma complementar e auxiliar na interpretação da ocorrência, as colônias foram também conservadas, em ágar nutriente, estriadas novamente no ágar de origem e avaliadas por técnica proteômica (MALDI ToF). Contrariando o esperado, as colônias foram identificadas como *Pseudomonas aeruginosa* e *Klebsiella pneumonia*. *Pseudomonas* é o gênero reconhecido pela predominância entre os microrganismos psicrotróficos do leite e, ainda, por sua ação deteriorante que provoca alterações na composição química dos alimentos e, conseqüentemente, em suas propriedades sensoriais. Porém, a preocupação do ponto de vista de saúde pública, está relacionada com a espécie *Pseudomonas aeruginosa*, patógeno oportunista que ocasiona infecções no ser humano, principalmente imunocomprometidos, podendo causar distúrbios intestinais, incluindo vômitos e diarreia (LUCIARDI et al., 2016). Ainda, está associada com a capacidade de formar biofilmes complexos e possuir resistência antimicrobiana (LIU et al., 2018). A presença da *Klebsiella pneumonia* também é alarmante, por ser um patógeno causador de várias doenças infecciosas em humanos com o sistema imune debilitado, incluindo septicemia e infecções do trato urinário, abscessos hepáticos, diarreia e pneumonia, sendo associada no âmbito hospitalar com aumento da morbidade e mortalidade dos pacientes. Nos últimos anos, os alimentos têm sido considerados importantes veiculadores deste patógeno (ZHOU et al., 2011; NERES et al., 2019).

Os resultados reforçam a necessidade de produzir de forma higiênica o queijo artesanal, com adoção de boas práticas e conscientização de hábitos adequados durante todo o processo de elaboração, se estendendo até a etapa de maturação com o intuito de mitigar ou reduzir a ocorrência microrganismos patógenos e deteriorantes.

Baseado nos dados obtidos, o tempo mínimo necessário para o queijo artesanal da Serra Geral-MG atender os padrões microbiológicos exigidos pela legislação é de 21 dias de maturação para o grupo PSIM, sendo classificado como queijo gordo, com baixo teor de umidade, seco e de massa dura. O grupo NSIM não alcançou os valores microbianos limites durante os 60 dias de maturação, apesar das características físico-químicas serem semelhantes ao PSIM.

3.4 Identificação proteômica das bactérias ácido-láticas

Considerando a identificação de BAL nos queijos artesanais da Serra Geral, no produto fresco foram selecionadas para análise 29 colônias puras, sendo identificadas 21 ao nível de espécies e uma ao nível de gênero, *Streptococcus*. No queijo maturado por 14 dias foram selecionadas para análise 36 colônias puras, sendo identificadas 17 ao nível de espécies e dois ao nível de gêneros, *Lactobacillus* e *Enterococcus*. Em amostras de queijo maturado por 21 dias foram selecionadas para análise 36 colônias puras, sendo identificadas 21 ao nível de espécies e seis ao nível de gêneros, sendo três *Lactobacillus* e três *Pediococcus*. Nas amostras de queijo com maturação de 60 dias foram selecionadas para análise 32 colônias puras, identificadas 25 ao nível de espécies e três ao nível de gêneros sendo dois *Lactobacillus* e um *Pediococcus*. Os morfotipos isolados dos queijos apresentaram características discrepantes, variando de tamanho (pequeno, médio e grande), cor (branca, creme e amarela) e formas (lisa, rugosa, circular e irregular).

As BAL presentes nos queijos do PSIM são representadas por *Enterococcus faecalis*, *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus paracasei*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactococcus lactis*, *Leuconostoc pseudomesenteroides*, *Pediococcus pentosaceus* (Figura III.3). É possível verificar que *Lactococcus lactis* foi a bactéria predominante no queijo fresco, sendo o queijo com 14 dias de maturação também uma importante fonte. Entretanto, no queijo maturado com 21 e 60 dias, não foi detectado o microrganismo. Esse fato pode ser explicado pelas modificações que ocorrem no queijo durante a maturação, do ponto de vista microbiológico, inicialmente há predomínio de um grupo de bactérias ácido-láticas, as iniciadoras ou “starters” e, com avançar do processo, as bactérias secundárias ou “non-starters” começam sua ação após redução do pH. O termo *starter* tem sido empregado devido ao fato dessas bactérias iniciarem a produção de ácido no meio que são encontradas ou inseridas.

Especificamente, esta microbiota inicial no queijo, é composta por microrganismos dos gêneros *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Leuconostoc* e *Enterococcus* (BERESFORD et al., 2001).

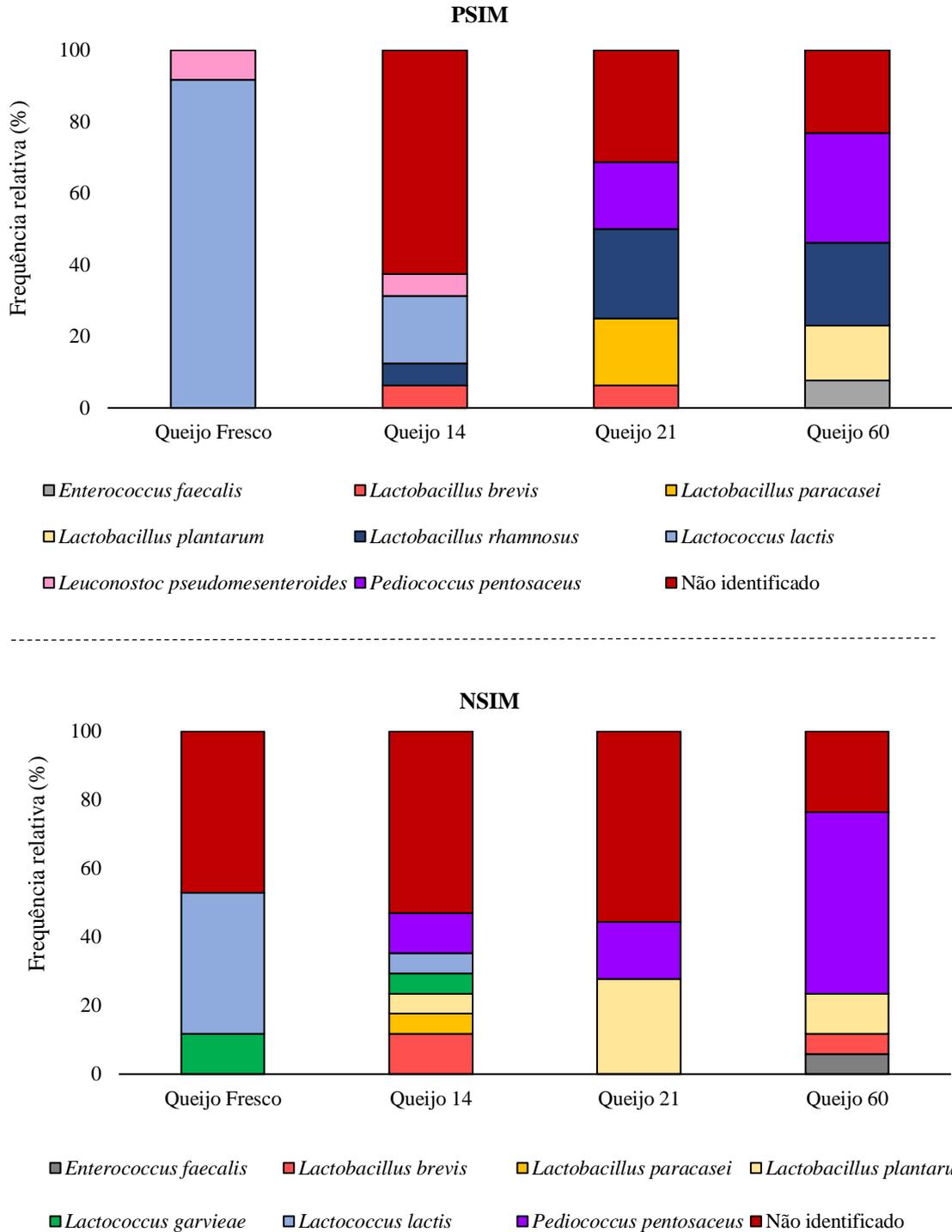


Figura III.3. Distribuição de frequência de bactérias ácido-láticas isoladas do queijo fresco e durante a maturação de 60 dias, pertencentes ao grupo de produtores que possuem o serviço de inspeção municipal (PSIM) e não possuem o serviço de inspeção municipal (NSIM).

Deve-se considerar que *Lactococcus* tem sua relevância, em função da ação proteolítica e capacidade de formação de aminas biogênicas (LEROY e DE VUYST, 2004; ÖZOGUL e HAMED, 2018). Embora o gênero seja considerado pouco proteolítico quando comparado a outros pertencentes ao grupo das BAL, *Lactococcus* possui um sistema enzimático constituído de protease extracelular, ligado a parede celular, com capacidade apenas da degradação inicial da caseína. Entretanto, é também constituído por peptidases intracelulares, liberadas apenas após a autólise celular da bactéria com ação até o final da maturação dos queijos (ARDO et al., 2017; WILKINSON e LAPOINTE, 2020)

Segundo Sant'Anna et al. (2019), é possível que, em períodos longos de maturação, a população de *Lactococcus* diminua gradativamente, ao passo que a população de microrganismos associados às fermentações tardias possa aumentar. Durante o processo de maturação, essas bactérias apresentam dificuldades fisiológicas de sobrevivência em razão de certas condições ambientais, como diminuição da atividade de água, acidificação e proteólise intensa, produzidas por outras bactérias do ecossistema (SILVA et al., 2012).

Com 14 dias de maturação pode ser observado no queijo artesanal da Serra Geral, uma frequência relativa de aproximadamente 18,8% de *Lactococcus lactis*, seguido igualmente de 6,3% de *Lactobacillus brevis*, *Leuconostoc pseudomesenteroides* e *Lactobacillus rhamnosus*. A presença desses microrganismos pode estar associada à resistência perante as condições físico-químicas do queijo definidas durante a maturação, bem como a interação e possível efeito sinérgico entre as espécies.

A presença de *Lactobacillus* nos queijos é desejável visto que esse gênero está envolvido no desenvolvimento de características que contribuem para o perfil sensorial dos queijos durante a maturação, constituindo a maioria das bactérias não *starters*. Esse gênero bacteriano é reconhecido por possuir espécies com capacidade de hidrolisarem proteínas a partir de proteinases intra e extracelulares ligadas à parede celular proporcionando a formação de aminoácidos livres (BERESFORD et al., 2001). Recentemente, foi publicada a reclassificação do gênero dos *Lactobacillus* agrupando as bactérias a partir de características fenotípicas e genotípicas semelhantes, originando 23 novos gêneros e reduzindo as 261 espécies, anteriormente existentes, para 38 espécies. O *Lactobacillus brevis* foi alterado para *Levilactobacillus brevis* enquanto o *Lactobacillus rhamnosus* passa a ser reconhecido como *Lacticaseibacillus rhamnosus* (ZHENG et al., 2020).

A amplificação e o sequenciamento do gene 16S rRNA vêm sendo realizados com o intuito de identificar a microbiota presente nos queijos artesanais. Bactérias do gênero

Lactobacillus apresentaram frequência mais elevada dentre as BAL isoladas de queijo Minas artesanal da região de Araxá, maturado por até 60 dias (SILVA, 2016). Outros gêneros bacterianos também foram destacados por Luiz et al. (2017), que identificaram *Enterococcus*, *Pediococcus*, *Lactococcus* e, principalmente, *Lactobacillus* com uma contribuição de 71% do total de microrganismos no QMA produzido também em Araxá-MG. Perim et al. (2017) também observaram a predominância dos *Lactobacillus* nos queijos artesanais da região do Serro, Canastra, Araxá, Serra do Salitre e Campo das Vertentes. Considerando o que é relatado na literatura, a presença de *Lactococcus* também é constatada em queijos artesanais, porém em menor predominância quando comparado a outros gêneros. Castro et al. (2016), avaliando o QMA da região de Campo das Vertentes, observaram que *Enterococcus faecalis* foi a espécie com maior frequência nas amostras de leite, pingo e queijo fresco, seguida por *Lactococcus lactis* e *Lactobacillus plantarum*.

Diferentemente do encontrado no queijo artesanal da Serra Geral fresco e com 14 dias de maturação, não foi identificado na literatura estudos que comprovem a presença de *Leuconostoc pseudomesenteroides* em queijos artesanais brasileiros. Considerando outros países, Biolcati et al. (2020) utilizando sequenciamento do gene 16S rRNA, também encontraram *Leuconostoc pseudomesenteroides* no queijo artesanal Robiola di Roccaverano de origem italiana, maturado por 15 dias, ainda que o microrganismo não tenha sido detectado no produto fresco. Ledina et al. (2018), utilizando a mesma técnica de identificação, também encontraram no queijo artesanal fresco produzido na Sérvia, enquanto Ouadghiri et al. (2005) trabalhando com a identificação por MALDI ToF detectou a bactéria no queijo artesanal tradicional de Marrocos. *Leuconostoc* é um dos principais gêneros de bactérias heterofermentativas com características tecnológicas benéficas em função da síntese de compostos aromáticos, como diacetil e acetoína a partir de citrato (MCAULIFFE et al., 2019).

Outras espécies foram encontradas em momentos mais tardios da maturação, *Lactobacillus paracasei* foi identificado no queijo com uma frequência de 23% aos 21 dias de maturação, enquanto *Lactobacillus plantarum* representa 12,3 % de frequência no queijo maturado por 60 dias, ainda, considerando a nova proposta são definidos como *Lactocaseibacillus paracasei* e *Lactiplantibacillus plantarum*, respectivamente (ZHENG et al., 2020).

Pediococcus pentosaceus também foi identificado no queijo com 21 e 60 dias de maturação com frequência predominante no final da maturação. Resultados similares foram observados por Carafa et al. (2015) em queijo artesanal Mountain Malga, produzido na Itália

com leite de vaca cru. Diversos estudos descrevem a capacidade de síntese de bacteriocinas de *Pediococcus pentosaceus*. No entanto, recentemente e de forma inédita, Møller et al. (2020) investigando a presença de bactérias formadoras de histamina em queijos disponíveis comercialmente, identificaram potencial de formação dessa amina pela espécie, reforçando a necessidade de estudos detalhados que elucide limites e concentrações de segurança de *P. pentosaceus*.

Por ter sido constatado crescimento de microrganismos não pertencentes ao grupo de bactérias ácido-láticas é apresentado na tabela III.4 para o PSIM, o perfil microbiológico do queijo fresco e maturado por 14, 21 e 60 dias, a partir do isolamento realizado em placas contendo o meio de cultura MRS. Foram identificadas leveduras no queijo maturado com 14 e 21 dias (*Candida tropicalis*) e no queijo maturado com 21 e 60 dias (*Candida krusei*), corroborando com os resultados da contagem de fungos com valores superiores no mesmo período de maturação, variando de 10^5 a 10^7 UFC/g. No queijo fresco não foi detectado crescimento no limite de quantificação estabelecido ($<1,0 \times 10^2$ UFC/g). Pereira et al. (2019), utilizando a mesma técnica de MALDI ToF, encontraram *Candida krusei* no queijo artesanal Serrano com 28 e 35 dias de maturação. Por outro lado, Lima et al. (2009) isolaram *Candida krusei* no leite, que serviu de matéria-prima para o processamento do QMA da região do Salitre. Embora as leveduras sejam raramente associadas com infecções de origem alimentar, estudos demonstraram que o alimento pode ser o veiculador de *Candida tropicalis* e *Candida krusei* considerados como patógenos oportunistas (BANJARA et al., 2015).

O perfil das BAL presente nos queijos do NSIM é constituído por *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus paracasei*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactococcus garvieae*, *Lactococcus lactis* e *Pediococcus pentosaceus* (Figura III.3). Também consta na tabela III.5, a frequência absoluta de identificação das bactérias ácido-láticas nos queijos artesanais frescos e maturados por 14, 21 e 60 dias. É possível observar que *Lactococcus lactis* foi predominante no queijo fresco com 41,2% de frequência relativa, estando presente também no queijo com 14 dias de maturação. Esse resultado reforça a tendência de comportamento do microrganismo, de não se adaptar em queijos com maturação mais avançada como observado por Vale (2018) para *Lactococcus* spp. no QMA do Serro.

Tabela III.4. Frequência absoluta da identificação de microrganismos em queijos artesanais frescos e maturados por 14, 21 e 60 dias pertencentes aos produtores que possuem o serviço de inspeção municipal (PSIM)

Espécie	Tempos de maturação (dias)			
	Fresco	14	21	60
<i>Candida krusei</i>	0	0	1	2
<i>Candida tropicalis</i>	0	2	1	0
<i>Enterococcus faecalis</i>	0	0	0	1
<i>Lactobacillus brevis</i>	0	1	1	0
<i>Lactobacillus paracasei</i>	0	0	3	0
<i>Lactobacillus plantarum</i>	0	0	0	2
<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	0	1	4	3
<i>Lactococcus lactis</i>	11	3	0	0
<i>Leuconostoc pseudomesenteroides</i>	1	1	0	0
<i>Pediococcus pentosaceus</i>	0	0	3	4
Não identificado	0	10	5	3
Total	12	18	18	15

Lactococcus garvieae foi identificado no queijo fresco e no queijo com 14 dias de maturação. Segundo Fernandez et al. (2010), a utilização de *L. garvieae* em produtos lácteos proporciona a manifestação de características sensoriais desejáveis, com propriedades tecnológicas semelhantes a espécie *L. lactis* em função da rápida formação de ácido láctico e baixa atividade proteolítica no queijo.

Assim como no grupo PSIM, algumas espécies foram apenas identificadas com o avançar da maturação. *Pediococcus pentosaceus* foi identificado no queijo com 14, 21 e 60 dias, apresentando maior frequência (64,3%) no final da maturação. *Lactobacillus paracasei*, considerando a nova proposta de classificação e taxonomia, *Lacticaseibacillus paracasei* (ZHENG et al., 2020) foi detectado apenas com 14 dias de maturação, em contrapartida as outras espécies do gênero *Lactobacillus brevis* ou *Levilactobacillus brevis* e *Lactobacillus plantarum* ou *Lactiplantibacillus plantarum* (ZHENG et al., 2020) foram identificadas com 14, 21 e 60 dias de maturação. *Lactobacillus* é um dos gêneros de BAL mais frequentemente isolado nos queijos artesanais. Resende et al. (2011), avaliando o perfil de bactéria ácido-lática do QMA da região da Canastra utilizando técnica molecular, encontraram prevalência de *L. rhamnosus* seguido por *L. casei*, *L. plantarum*, *L. hilgardii* e *L. paraplantarum*. Do mesmo modo, Ballesteros et al. (2006), identificando BAL no queijo espanhol Manchego por meio de provas bioquímicas, constataram predominância de bactérias do gênero *Lactobacillus*. Margalho et al. (2020), utilizando a técnica do MALDI ToF para avaliar a diversidade de BAL dos queijos artesanais brasileiros, atribuíram a predominância do gênero *Enterococcus*

encontrado nos queijos de Marajó, Coalho e Manteiga, a característica comum existente na etapa de cozimento da massa, considerando que os microrganismos apresentam elevada resistência térmica.

Tabela III.5. Frequência absoluta de identificação de microrganismos em queijos artesanais frescos e maturados por 14, 21 e 60 dias pertencentes aos produtores que possuem o serviço de inspeção municipal (NSIM)

Espécie	Tempos de maturação (dias)			
	Fresco	14	21	60
<i>Candida krusei</i>	0	1	0	0
<i>Enterococcus faecalis</i>	0	0	0	1
<i>Lactobacillus brevis</i>	0	2	0	1
<i>Lactobacillus paracasei</i>	0	1	0	0
<i>Lactobacillus plantarum</i>	0	1	5	2
<i>Lactococcus garvieae</i>	2	1	0	0
<i>Lactococcus lactis</i>	7	1	0	0
<i>Pediococcus pentosaceus</i>	0	2	3	9
Não identificado	8	9	10	4
Total	17	18	18	17

É possível observar que certas colônias de BAL encaminhadas para análise proteômica não foram identificadas ao nível de gênero e ao nível de espécie em queijo fresco do NSIM e queijos maturados com 14, 21 e 60 dias de ambos os grupos de produtores (Figura III.3). A dificuldade de identificação dos microrganismos por meio da técnica de MALDI ToF pode estar relacionada a ausência de pureza da colônia isolada em etapa prévia, a desatualização do banco de dados no que se diz respeito à diversidade microbiana, bem como, uma possível limitação para distinguir espécies com características semelhantes (BOU et al., 2011).

Lactococcus lactis foi a espécie de bactérias ácido-láticas mais frequente no queijo durante a etapa inicial da maturação. Entretanto, apesar do derivado lácteo ser produzido na mesma região da Serra Geral-MG, é notado no ambiente, no próprio queijo artesanal, especificamente maturado com 14, 21 e 60 dias, um diferente perfil de bactérias ácido-láticas quando comparados os produtores do PSIM e NSIM. Provavelmente, o processo produtivo específico em cada grupo, estabelece condições para definir uma microbiota.

3.5 Aminoácidos livres e aminos bioativas do leite utilizado como matéria-prima para elaboração dos queijos artesanais da Serra Geral-MG

Os perfis de aminos bioativas, aminoácidos livres e íon amônio do leite cru estão demonstrados na tabela III.6. Não foi observada diferença estatística ($p > 0,05$) quando comparado os dois grupos de produtores (PSIM e NSIM), sendo detectado dez aminoácidos livres, dentre os 20 pesquisados e três aminos bioativas, sendo pesquisadas onze no leite cru.

Considerando a contribuição de cada aminoácido ao teor total, observa-se predominância da histidina (5,18 mg/100 mL), enquanto, os outros aminoácidos, não ultrapassaram quantidades individuais de 1,0 mg/100 mL. A histidina, por ser um aminoácido essencial, fornece às proteínas lácteas, importante propriedade nutricional (FENNEMA, 2010). As subunidades estruturadoras das proteínas, possuem funções específicas essenciais para o funcionamento do organismo, e sua presença no leite, além de estar associada a benefícios à saúde, tecnologicamente, contribuem para o sabor do leite e seus derivados. Entretanto, podem atuar como precursores na síntese de aminos bioativas (TAVARES e VANNUCCHI, 2016; RUIZ-CAPILLA e HERRERO, 2019).

Segundo Park (2017), o leite bovino é representado principalmente pelos aminoácidos glutamina, leucina, lisina, prolina e asparagina, entretanto, esse perfil pode ser influenciado pela hidrólise proteica, oriunda da microbiota proteolítica contaminante, uma vez que são aminoácidos componentes das caseínas e proteínas do soro. McDermott et al. (2016), avaliando o perfil de aminoácidos livres do leite bovino, encontraram maior concentração de glutamina e menor concentração de serina. Entretanto, ressalta-se que esse resultado pode ser influenciado pela qualidade do leite e fase de lactação, cuja concentração de aminoácidos livres totais, é maior no início e no final, quando comparada a fase intermediária da lactação.

Quanto às aminos bioativas, foram identificadas no leite a histamina, putrescina e tiramina, sendo a primeira, a mais abundante (3,42 mg/100 mL). O perfil constatado, possivelmente é consequência das contagens microbiológicas encontradas no leite (Capítulo II). Espécies da família Enterobacteriaceae apresentam capacidade de descarboxilar aminoácidos e, conseqüentemente, produzem histamina, tiramina e putrescina, enquanto, os gêneros *Lactobacillus* e *Enterococcus* podem produzir elevadas concentrações de histamina e tiramina (MARINO et al., 2000). Ainda, a putrescina tem sido utilizada como biomarcadores de deterioração em alimentos por estar relacionada com a perda de qualidade (MUSTAFA e ANDREESCU, 2018; RUIZ-CAPILLA e HERRERO, 2019).

Tabela III.6. Valores médios, medianas, coeficiente de variação (CV), valores mínimos e máximos dos aminoácidos livres e aminos bioativas no leite utilizado como matéria-prima para produção do queijo artesanal da Serra Geral-MG

Parâmetros	PSIM	CV (%)	Mínimo	Máximo	NSIM	CV (%)	Mínimo	Máximo	P-valor
Íon amônio**	0,11a	244,95	0,00	0,65	0,25a	244,9	0,00	1,53	0,64
Aminoácidos (mg/100 mL)									
Alanina*	0,42a	95,2	0,14	1,75	0,17a	13,4	0,15	0,21	0,24
Asparagina**	0,37a	124,6	0,00	1,01	0,20a	156,1	0,00	0,67	0,56
Glicina**	0,33a	244,9	0,00	1,95	0,74a	97,5	0,00	1,72	0,28
Glutamina + ácido glutâmico**	1,00a	44,57	0,17	1,38	0,79a	44,8	0,39	1,24	0,32
Histidina**	5,18a	67,22	0,81	8,88	6,40a	43,6	1,45	9,73	0,60
Lisina**	0,16a	55,73	0,00	0,26	0,21a	39,4	0,11	0,32	0,41
Ornitina*	0,05a	126,2	0,00	0,36	0,00a	166,4	0,00	0,10	0,27
Prolina**	0,10a	60,96	0,00	0,17	0,09a	78,6	0,00	0,21	0,78
Serina + ácido aspártico**	0,65a	41,24	0,27	1,03	0,91a	36,8	0,65	1,43	0,21
Valina**	0,06a	183,0	0,00	0,29	0,18a	88,9	0,00	0,34	0,08
Aminoácidos livres totais**	9,23 a	48,8	4,18	16,38	9,83a	26,6	5,05	12,76	0,83
Aminas bioativas (mg/100 mL)									
Histamina* *	3,42a	81,3	1,47	7,75	3,37a	87,62	0,88	9,02	0,97
Putrescina**	0,17a	84,9	0,00	0,37	0,32a	38,8	0,23	0,55	0,07
Tiramina**	0,13a	128,5	0,00	0,41	0,23a	66,45	0,00	0,45	0,17
Aminas bioativas totais**	3,72a	78,2	1,47	8,53	4,06a	82,2	1,34	10,40	0,85

* Medianas ** Médias; PSIM = produtores que possuem inspeção municipal; NSIM = produtores não possuem inspeção municipal; nd = não detectado.

Médias seguidas de letras minúsculas distintas na mesma linha diferem entre si pelo teste F ou medianas seguidas de letras minúsculas distintas na mesma linha diferem entre si pelo teste Wilcoxon Mann-Whitney ($p < 0,05$). A média ou mediana foram calculadas considerando os valores não detectados iguais a zero. Alguns aminoácidos e aminos bioativas livres não foram detectados, sendo os limites de quantificação: Arginina = 1,39; Asparagina = 0,52; Isoleucina = 1,05; Leucina = 1,05; Metionina = 1,19; Fenilalanina = 1,32; Tirosina = 1,45; Treonina = 0,95; Agmatina = 1,04; Cadaverina = 0,82; Histamina = 0,89; Feniletilamina = 0,97; Serotonina = 1,41; Espermina = 1,88; Espermidina = 1,16; Triptamina = 1,28 mg/100 mL.

Deve-se destacar que o aminoácido precursor da histamina, a histidina, foi predominante no leite em ambos os grupos, justificando os resultados encontrados para essa amina biogênica. Segundo EFSA (2011), a presença de qualquer quantidade de histamina pode causar efeitos adversos para indivíduos sensíveis à mesma. No entanto, o NOAEL é de 50 mg de histamina para indivíduos normais.

Diferentemente do encontrado no leite utilizado como matéria-prima para os queijos da Serra Geral, Gloria et al. (2011), avaliando o perfil e a quantidade de aminas no leite de vaca, detectaram maior concentração de espermina, espermidina e feniletilamina, sendo a espermina a amina prevalente, contribuindo com 35% do total. Segundo Rigueira et al. (2011), é comum identificar no leite diferentes perfis de aminas bioativas, além de baixos teores.

O perfil de aminas biogênicas encontradas no leite cru utilizado para produção do queijo artesanal da Serra Geral-MG pode estar associado à contagem de células somáticas e à qualidade microbiológica, evidenciando a importância do leite ser oriundo de uma glândula mamária saudável, obtido com higiene, evitando a contaminação do produto. Apesar de não ser uma realidade para a matéria-prima dos queijos artesanais mineiros, Munoz-Sparza et al. (2019) ressaltaram a importância da utilização do tratamento térmico do leite, não apenas por garantir a ausência de patógenos, mas também para evitar a formação de aminas biogênicas em consequência da redução de microrganismos capazes de produzir enzimas descarboxiladoras de aminoácidos e fosfato piridoxal, um cofator termolábil, necessário para atividade das descarboxilases.

3.6 Índice de proteólise dos queijos artesanais da Serra Geral-MG ao longo de 60 dias de maturação

A proteólise dos queijos artesanais produzidos na região da Serra Geral-MG foram influenciados pelo tempo de maturação ($p < 0,05$) com aumento dos índices de extensão e profundidade durante os 60 dias de maturação nos queijos PSIM e com 21 e 60 dias no queijo NSIM (Tabela III.7), sendo constatado o efeito linear crescente (Figura III.4). Comportamento semelhante, de aumento da proteólise durante a etapa de maturação, foi observado por outros autores que avaliaram o QMA das regiões do Serro (Carneiro et al., 2020), Canastra (Silva et al., 2011) e Campo das Vertentes (COSTA JÚNIOR et al., 2014). Valores de extensão e profundidade em torno de 9 % e 4%, respectivamente, foram encontrados por Pinto et al. (2016) avaliando o queijo artesanal fresco, produzido em Montes Claros. Esses resultados estão dentro

da faixa observada no queijo artesanal fresco, com 14 e 21 dias de maturação do queijo da Serra Geral-MG.

Tabela III.7. Valores médios e desvio padrão da extensão e profundidade de proteólise para o queijo artesanal da Serra Geral-MG ao longo da maturação

Índices de proteólise	Grupo de produtores	Tempos de maturação (dias)			
		1	14	21	60
Extensão (%)	PSIM	10,48 ± 7,01Ab	10,55 ± 3,58Ab	10,67 ± 1,53Ab	17,63 ± 3,27Aa
	NSIM	8,07 ± 1,50Ab	13,25 ± 2,50Ab	18,12 ± 3,98Aa	19,62 ± 11,23Aa
Profundidade (%)	PSIM	5,50 ± 3,66Ab	5,55 ± 3,18Ab	6,77 ± 0,72Ab	9,01 ± 2,82Aa
	NSIM	2,82 ± 0,51Ab	5,91 ± 1,61Aab	7,59 ± 6,09Aa	8,99 ± 4,91Aa

PSIM = produtores que possuem inspeção municipal; NSIM = produtores não possuem inspeção municipal; *Médias seguidas de letras maiúsculas distintas na coluna, considerando a mesma variável, diferem o grupo de produtores pelo teste F ($p < 0,05$) e médias seguidas de letras minúsculas distintas na mesma linha, diferem o tempo de maturação pelo teste Tukey ($p < 0,05$).

Embora se saiba que grande parte das alterações proteolíticas no leite e derivados, sejam predominantemente provocadas por outros grupos microbianos, como as bactérias ácido-láticas e microrganismos psicrotóxicos, algumas pesquisas demonstraram ação da microbiota mesófila, incluindo Enterobacteriaceae, com capacidade de degradação da proteína (HADDADI et al., 2005; TEBALDI et al., 2008), podendo esse fato, também justificar os índices de proteólise do queijo artesanal da Serra Geral-MG, associado às contagens encontradas de *E. coli* ao longo da maturação.

A extensão da proteólise, é causada principalmente pela ação do coalho, mas as proteases presentes no leite, também contribuem para degradação da proteína em peptídeos de alto peso molecular, podendo ter efeito durante a maturação devido a ação da quimosina residual. Quanto, à profundidade da proteólise, o que mais influencia é a microbiota presente no queijo, que no caso dos produtos artesanais, podem ter a origem no leite, pingo e ambiente (COSTA JÚNIOR et al., 2014).

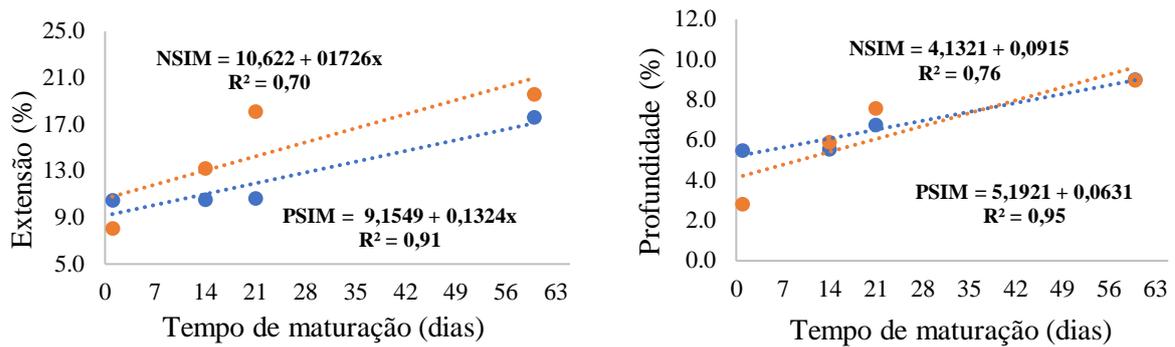


Figura III.4 – Regressão linear para a extensão e profundidade da proteólise dos queijos artesanais da Serra Geral-MG maturados durante 60 dias.

3.7 Aminoácidos livres e amins bioativas dos queijos ao longo de 60 dias de maturação

Os perfis de aminoácidos livres e íon amônio do queijo artesanal da Serra Geral-MG fresco e maturado com 14, 21 e 60 dias estão demonstrados na tabela III.8. Foi observada uma tendência de concentração dessas variáveis durante a maturação com diferenças significativas ($p < 0,05$). Estes resultados corroboram com o aumento dos índices de proteólise ao longo da maturação.

Pode-se observar que os teores totais de aminoácidos livres nos queijos PSIM e NSIM foram diferentes em todos os tempos de maturação ($p < 0,05$), com acúmulo aos 60 dias, mas com teores similares ($p > 0,05$) quando comparados os dois grupos, com exceção apenas dos aminoácidos cistina, GABA e histidina. Os peptídeos e aminoácidos livres formados durante essa etapa, desempenham papel importante nas propriedades sensoriais e nutricionais do queijo, sendo comum a hidrólise da proteína nos primeiros 60 dias de maturação, tendendo a se estabilizar apenas com 12 meses (TOSI et al., 2008).

Entre os aminoácidos livres encontrados no queijo artesanal da Serra Geral-MG maturado por 60 dias, fenilalanina, leucina e lisina destacaram-se como os mais abundantes, sendo estes aminoácidos essenciais (FENNEMA, 2010). De acordo com Fox et al. (2000), fenilalanina e leucina contribuem para o sabor amargo no queijo, com limiar de percepção de 90 e 190 (mg/100g) respectivamente, valores próximos aos encontrados no queijo artesanal da Serra Geral-MG (PSIM e NSIM) com 60 dias de maturação. Segundo Engels et al. (1997), a identificação e quantificação individual dos aminoácidos livres do queijo contribui para o pronunciamento do sabor específico que caracteriza a variedade.

Tabela III.8. Valores medianos, mínimos e máximos dos aminoácidos livres e íon amônio (mg/100 g) em queijos artesanais da Serra Geral-MG ao longo da maturação

Variável	Grupo de produtores	Tempos de maturação (dias)			
		Fresco	14	21	60
Alanina	PSIM	2,90Ac (nd - 10,29)	8,53Abc (nd - 23,10)	13,97Ab (2,52 - 23,29)	36,49Aa (0,76 - 51,25)
	NSIM	2,71Ab (nd - 5,12)	ndAb (nd - 11,67)	11,00Aab (0,18 - 17,27)	15,08Aa (nd - 39,44)
Arginina	PSIM	nd	1,94Ab (nd - 12,90)	8,27Aa (nd - 34,31)	0,68Ab (nd - 5,60)
	NSIM	nd	5,99Ab (nd - 11,45)	2,48Ab (nd - 14,40)	3,52Aa (nd - 87,95)
Asparagina	PSIM	ndb (nd - 11,43)	nd	5,17Ab (nd - 23,30)	21,88Aa (11,58 - 59,79)
	NSIM	nd	nd	nd	16,58Aa (nd - 36,27)
Cistina	PSIM	ndAc (nd - 3,70)	ndAbc (nd - 4,87)	4,56Ab (nd - 7,07)	9,38Ba (nd - 22,35)
	NSIM	nd	ndAc (nd - 2,23)	3,45Ab (nd - 5,74)	11,73Aa (nd - 24,32)
Fenilalanina	PSIM	3,37Ac (nd - 4,73)	2,35 Ac (nd - 38,57)	55,10Ab (4,42 - 78,12)	85,80Aa (25,94 - 112,82)
	NSIM	ndAc (nd - 5,99)	31,37Ab (14,57 - 40,96)	33,79Aab (0,56 - 15,37)	45,96Aa (27,08 - 121,68)
GABA	PSIM	ndAc (nd - 1,30)	ndBc (nd - 0,79)	8,07Ab (nd - 69,19)	36,63Aa (10,86 - 82,73)
	NSIM	nd	2,85Aa (nd - 16,38)	3,44Ba (nd - 17,17)	6,17Ba (nd - 13,55)
Glicina	PSIM	ndAc (nd - 6,28)	ndAc (nd - 8,07)	20,10Ab (nd - 41,86)	33,39Aa (9,18 - 84,47)
	NSIM	ndAb (nd - 4,94)	nd	13,9Aa (6,77 - 23,78)	21,05Aa (4,98 - 31,55)
Glutamina + ácido glutâmico	PSIM	ndAc (nd - 0,48)	0,59Ac (nd - 4,14)	14,04Aa (nd - 22,22)	ndAbc (0,83 - 34,74)
	NSIM	ndAd (nd - 4,94)	1,96Ac (nd - 4,25)	11,95Ab (4,99 - 14,38)	44,10Aa (6,31 - 99,65)
Histidina	PSIM	ndAc (nd - 7,04)	ndAc (nd - 7,14)	3,52Ab (nd - 16,20)	21,95Aa (nd - 13,34)
	NSIM	ndAc (nd - 2,54)	nd	3,08Ab (nd - 9,76)	16,28Ba (7,66 - 42,96)
Isoleucina	PSIM	ndAd (nd - 0,64)	6,39Ac (nd - 12,44)	11,53Ab (1,13 - 20,52)	32,43Aa (13,64 - 50,72)
	NSIM	nd	5,61Ac (2,72 - 10,05)	9,02Ab (4,81 - 12,55)	26,66Aa (8,41 - 68,93)
Leucina	PSIM	3,54Ac (0,64 - 9,05)	3,04Ac (nd - 62,99)	4,80Ab (nd - 104,72)	160,89Aa (56,49 - 218,94)
	NSIM	1,09Ad (nd - 5,44)	40,77Ac (17,83 - 51,02)	57,16Ab (30,53 - 67,20)	96,18Aa (45,07 - 210,19)
Lisina	PSIM	3,03Ac (1,23 - 8,44)	3,94Ac (nd - 13,34)	26,65Ab (5,62 - 35,39)	73,97Aa (24,56 - 114,46)
	NSIM	1,59Ad (nd - 4,03)	7,35Ac (3,11 - 14,86)	16,57Ab (9,91 - 19,66)	53,20Aa (25,52 - 130,67)
Metionina	PSIM	2,80Ac (nd - 8,95)	2,13Ac (nd - 37,83)	13,38Ab (nd - 23,63)	36,49Aa (0,76 - 51,25)
	NSIM	nd	7,62Ab (nd - 26,62)	8,29Ab (0,53 - 16,04)	19,22Aa (11,32 - 54,13)
Ornitina	PSIM	2,04Ab (0,46 - 2,55)	0,92Ac (nd - 19,48)	30,64Aa (2,20 - 45,00)	37,78Aa (5,89 - 50,12)
	NSIM	0,48Bb (nd - 1,46)	ndAc (nd - 5,45)	16,23Aa (8,19 - 38,24)	16,28Aa (7,13 - 82,52)
Prolina	PSIM	1,71Ab (nd - 3,34)	0,74Ab (nd - 4,45)	0,55Ab (nd - 5,73)	13,58Aa (8,75 - 27,26)
	NSIM	0,77Ab (nd - 1,52)	1,77Ab (0,80 - 2,64)	0,98Ab (nd - 13,34)	9,01Aa (3,47 - 33,76)

Tabela III.8. Continua

Variável	Grupo de produtores	Tempos de maturação (dias)			
		Fresco	14	21	60
Serina + ácido aspártico	PSIM	nd	nd	13,39 Ab (0,30 - 7,27)	16,88 Aa (6,55 - 49,00)
	NSIM	nd	3,44 Aa (nd - 20,84)	nd	nd Ab (nd - 13,60)
Tirosina	PSIM	1,84 Ac (nd - 2,51)	6,99 Ab (nd - 17,96)	13,36 Ab (nd - 19,22)	34,70 Aa (nd - 13,34)
	NSIM	nd Bc (nd - 0,37)	5,04 Ab (nd - 8,31)	7,59 Bb (0,56 - 15,37)	14,60 Aa (5,58 - 39,87)
Treonina	PSIM	nd Ab (nd - 4,80)	nd Ab (nd - 5,23)	nd Ab (nd - 12,99)	36,03 Aa (18,03 - 67,13)
	NSIM	nd Ac (nd - 2,26)	1,32 Ac (nd - 4,72)	9,91 Ab (nd - 15,61)	33,58 Aa (12,73 - 55,56)
Triptofano	PSIM	nd	1,61 Ac (nd - 11,83)	16,63 Ab (nd - 22,56)	22,87 Aa (5,70 - 27,16)
	NSIM	nd	7,70 Ab (nd - 25,46)	13,29 Aab (6,73 - 21,95)	8,92 Ab (7,74 - 42,25)
Valina	PSIM	nd Ac (nd - 0,77)	nd Bc (nd - 0,64)	29,38 Ab (5,69 - 46,85)	63,31 Aa (34,04 - 97,33)
	NSIM	nd Ac (nd - 1,61)	nd Ac (nd - 23,31)	25,05 Ab (10,14 - 31,02)	42,84 Aa (16,81 - 123,39)
Aminoácidos livres totais	PSIM	29,82 Ad (6,76 - 17,33)	78,17 Ac (14,43 - 212,60)	336,19 Ab (41,36 - 538,09)	850,13 Aa (264,47 - 1089,25)
	NSIM	7,25 Ad (nd - 37,42)	148,59 Ac (86,86 - 204,25)	266,84 Ab (155,31 - 1328,66)	526,71 Aa (241,28 - 1259,79)
Íon amônio	PSIM	7,21 Ab (nd - 11,60)	3,3 Ac (nd - 11,77)	31,95 Aa (13,71 - 42,80)	44,72 Aa (21,70 - 55,57)
	NSIM	7,56 Ab (nd - 13,41)	0,94 Ac (nd - 5,62)	28,12 Aa (22,44 - 34,82)	37,37 Aa (20,29 - 74,35)

PSIM = produtores que possuem inspeção municipal; NSIM = produtores não possuem inspeção municipal; nd = não detectado.

Medianas seguidas de letras minúsculas distintas na mesma linha, diferem entre si pelo teste Friedman ($p < 0,05$) e medianas seguidas de letras maiúsculas distintas na mesma coluna diferem o grupo de produtores pelo teste Wilcoxon Mann-Whitney ($p < 0,05$). As medianas foram calculadas considerando os valores não detectados iguais a zero. Alguns aminoácidos livres não foram detectados, sendo os limites de quantificação: Arginina = 1,39; Asparagina = 052; Glicina = 060; Isoleucina = 1,05; Histidina = 0,92; Leucina = 1,05; Metionina = 1,19 mg/100 g.

Outros aminoácidos livres também são importantes no desenvolvimento do sabor dos queijos, como a arginina, relacionada ao sabor similar aos componentes gordurosos, enquanto a prolina, a serina e a asparagina estão relacionadas com o sabor doce (TAVARIA et al., 2003). Nota-se que no queijo artesanal da Serra Geral, esses aminoácidos apresentam-se em maiores quantidades a partir de 21 dias de maturação. Vários fatores podem interferir no perfil e na quantidade de aminoácidos livres em queijo, como, tempo de maturação e microbiota presente, bem como, pH e teor de sal são características intrínsecas e extrínsecas do alimento, que influenciam diretamente nas reações proteicas (DIANA et al., 2014). Segundo Urbach (1995), deve-se considerar a ação do coalho, que é responsável pela formação de peptídeos, sendo também capaz de produzir na coalhada do queijo, metionina, histidina, glicina, serina e ácido glutâmico a níveis quantificáveis.

Do ponto de vista nutricional, aspectos benéficos são também descritos para alguns aminoácidos, sugerindo o seu uso como componentes de alimentos funcionais. GABA é associado com diversas atividades promotoras da saúde a partir de propriedades antioxidantes, anti-hipertensivas, antidiabetes, anti-inflamatórias, hepato-protetoras e proteção do intestino (NGO e VO, 2019). Dessa forma, o aumento de GABA constatado ao longo da maturação do queijo artesanal da Serra Geral-MG, estando o queijo do PSIM com quantidades superiores ao NSIM no tempo de 21 e 60 dias de maturação, se torna opção interessante como fonte desse nutriente, naturalmente encontrado no queijo da região.

Quanto às aminas bioativas no queijo artesanal da Serra Geral, foram detectadas oito, dentre as 11 pesquisadas (Tabela III.9). Agmatina, epinefrina, serotonina e triptamina não estavam presentes no queijo artesanal da Serra Geral, MG fresco. Espermidina, espermina e feniletilamina não foram encontradas em nenhum tempo de maturação dos queijos. Também foi constatado o efeito da maturação sobre todas as aminas ($p < 0,05$), exceto a agmatina no queijo pertencente ao NSIM e putrescina (PSIM e NSIM) que mantiveram os teores durante o tempo de 14 dias até 60 dias de maturação ($p > 0,05$).

Histamina foi a única amina estudada com quantidade superior no queijo fresco, quando comparada aos tempos de 14, 21 e 60 dias de maturação. Esse fenômeno, de redução nas concentrações da histamina ao longo da maturação pode ser justificado pela possível utilização dessa amina, como fonte de nitrogênio, pelas BAL (GLORIA e VIEIRA, 2007). Além disso, histamina foi a amina mais abundante no leite utilizado como matéria-prima na fabricação dos queijos, e dessa forma, permanecendo com valores medianos que representariam um risco de consumo, pelas pessoas sensíveis.

Tabela III.9. Valores medianos, mínimos e máximos das aminas bioativas livres (mg/100 g) em queijos artesanais da Serra Geral-MG ao longo da maturação

Variável	Grupo de produtores	Tempos de maturação (dias)			
		Fresco	14	21	60
Agmatina	PSIM	nd	nd Ab (nd – 3,06)	1,48 Ab (nd – 7,60)	5,19 Aa (nd – 8,47)
	NSIM	nd	nd Aa (nd – 4,73)	nd Aa (nd – 3,70)	nd Aa (nd – 4,12)
Cadaverina	PSIM	0,18 Ac (nd – 3,50)	0,46 Bb (nd – 1,15)	2,42 Ba (nd – 8,01)	3,92 Aa (nd – 8,43)
	NSIM	0,96 Ab (nd – 3,51)	8,58 Aa (3,54 – 15,42)	9,49 Aa (2,32 – 14,06)	9,73 Aa (2,29 – 14,04)
Epinefrina	PSIM	nd	nd	1,33 Ab (nd – 7,67)	6,73 Aa (nd – 14,32)
	NSIM	nd	nd	nd Ab (nd – 0,56)	0,78 Ba (nd – 4,00)
Histamina	PSIM	6,32 Aa (5,19 – 9,99)	2,15 Abc (nd – 6,20)	4,64 Abc (4,19 – 5,97)	4,28 Ab (nd – 5,92)
	NSIM	6,44 Aa (4,47 – 17,72)	2,27 Ab (nd – 23,95)	3,89 Ac (3,14 – 5,51)	3,81 Ad (nd – 4,82)
Serotonina	PSIM	nd	nd Ab (nd – 15,09)	10,48 Aa (nd – 20,32)	8,95 Aa (nd – 22,93)
	NSIM	nd	5,52 Aa (nd – 11,87)	2,06 Ab (nd – 11,07)	1,84 Ab (nd – 19,57)
Putrescina	PSIM	0,38 Aa (nd – 1,57)	nd Aa (nd – 2,62)	nd Aa (nd – 3,12)	0,49 Aa (nd – 5,90)
	NSIM	nd Aa (nd – 1,29)	0,32 Aa (nd – 2,63)	0,25 Aa (nd – 1,20)	nd Aa (nd – 20,57)
Tiramina	PSIM	nd	0,0 Bb (nd – 5,92)	3,68 Ab (nd – 21,92)	8,97 Aa (nd – 48,07)
	NSIM	nd	12,61 Ab (nd – 16,01)	13,53 Aab (nd – 15,92)	21,85 Aa (nd – 50,28)
Triptamina	PSIM	nd Ab (6,76 – 17,33)	0,0 Ab (nd – 10,32)	9,05 Aa (nd – 10,62)	8,16 Aa (6,54 – 15,95)
	NSIM	nd Ab (nd – 13,29)	nd	8,04 Aa (5,87 – 9,78)	6,36 Aa (3,61 – 11,80)
Total de aminas bioativas	PSIM	8,74 Ad (nd – 1,57)	14,17 Ac (0,92 – 21,02)	36,56 Ab (18,13 – 73,46)	44,92 Aa (18,56 – 95,45)
	NSIM	9,48 Ab (4,47 – 21,92)	30,71 Aa (10,72 – 54,13)	40,51 Aa (18,06 – 52,49)	45,53 Aa (12,88 – 118,33)

PSIM = produtores que possuem inspeção municipal; NSIM = produtores não possuem inspeção municipal; nd = não detectado.

Medianas seguidas de letras minúsculas distintas na mesma linha, diferem entre si pelo teste Friedman ($p < 0,05$) e letras maiúsculas distintas na mesma coluna diferem o grupo de produtores pelo teste Wilcoxon Mann-Whitney ($p < 0,05$). As medianas foram calculadas considerando os valores não detectados iguais a zero. Algumas aminas não foram detectadas, sendo os limites de quantificação: Agmatina = 1,04; Serotonina = 1,41; Espermina = 1,88; Espermidina = 1,16; Tiramina = 1,10 e Triptamina = 1,28 mg/100 g.

Quanto à cadaverina, pode-se observar que houve uma concentração durante a maturação, atingindo os maiores teores nos queijos do grupo PSIM com 21 e 60 dias, e a partir de 14 dias de maturação no queijo NSIM. Entretanto, ao se comparar os queijos do PSIM e NSIM com 14 e 21 dias de maturação, o teor de cadaverina foi superior no último grupo, podendo esses resultados estarem relacionados com a maior quantidade de *Escherichia coli* ($5,0 \times 10^5$ UFC/g,) encontradas, especificamente no mesmo tempo de maturação. Enterobacteriaceae apresentam habilidade em descarboxilar a lisina e formar cadaverina. Dessa forma, a presença dessa amina em queijo está relacionada à microbiota indesejável, a qual sugere contaminação do alimento (MARINO et al., 2000).

Tiramina não foi detectada no queijo artesanal da Serra Geral-MG nos primeiros dias de maturação, começando a ser formada, significativamente ($p < 0,05$), com 14 dias nos queijos oriundos de ambos os grupos de produtores. Considerando os efeitos adversos a saúde humana, é definido o limite de 600 mg de tiramina por refeição em indivíduos saudáveis, mas para indivíduos que utilizam medicamentos inibidores de monoaminoxidase (IMAO), o limite reduz para 6 mg de tiramina por refeição (EFSA, 2011), demonstrando nessa condição, o risco do consumo do queijo artesanal da Serra Geral-MG, especificamente, os queijos pertencentes ao grupo NSIM a partir de 14 dias de maturação e os queijos oriundos do PSIM a partir de 21 dias de maturação. As espécies *Lactobacillus brevis* e *Lactobacillus paracasei*, identificadas nos queijos maturados de ambos os grupos de produtores (PSIM e NSIM) são organismos conhecidos por produzir tiramina a partir da descarboxilação de tirosina (CHRISTENSEN et al., 1999; RUIZ-CAPILLAS e HERRERO, 2019). Perin et al. (2017b), avaliando o perfil de aminas bioativas associado a síntese por microrganismos, identificaram cinco espécies do gênero *Lactococcus* e sete espécies de *Enterococcus* como produtores de tiramina. A tiramina foi a amina biogênica mais abundante em outros queijos artesanais (ONER et al., 2006; ESPINOSA-PESQUEIRA et al., 2018).

Epinefrina, formada a partir da tirosina, foi detectada a partir de 21 dias de maturação no queijo artesanal da Serra Geral em ambos os grupos de produtores, entretanto, foi superior no queijo PSIM, com 60 dias de maturação. Adrenalina, como popularmente é conhecida a epinefrina, é um neurotransmissor, envolvido no aumento dos batimentos cardíacos, constrição dos vasos sanguíneos e elevação da pressão arterial que auxiliam o organismo em resposta a situação de bem-estar ou perigo (MAZLOUM-ARDAKANI et al., 2010; PRADHAN et al., 2014).

Considerando o total de aminas bioativas, pode-se observar que os maiores teores são encontrados, conforme esperado, em queijos com 60 dias de maturação nos dois grupos (PSIM e NSIM), já que há o efeito adicional de grande parte das aminas com tendência de concentração. Entretanto, o queijo artesanal da Serra Geral-MG, pode ser considerado seguro para pessoas saudáveis. Deve-se considerar que a atividade proteolítica aumenta com o avançar da maturação, contribuindo para o aumento da disponibilidade de aminoácidos livres, reações de descarboxilação e eventualmente a formação das aminas bioativas (SANLI e SENEL, 2015).

As variações de aminoácidos livres e aminas bioativas constatadas nos queijos da Serra Geral-MG ao longo da maturação podem ser justificadas pelas diferenças no processo produtivo, associado a microbiota e qualidade da matriz alimentar, refletindo diferentes níveis de proteólise.

3.8 Análise multivariada aplicada aos dados dos queijos

A análise de componentes principais (PCA) foi aplicada aos dados físico-químicos, microbiológicos, índices de proteólise, perfil de aminoácidos livres e aminas bioativas do queijo artesanal da Serra Geral, sendo os resultados apresentados na figura III.5. Os dois primeiros componentes explicaram 70,6% da variância total, sendo que o CP1 contribuiu com 43,9% e CP2 com 26,7%. Pode-se verificar a separação das variáveis do queijo de acordo com o tempo de maturação, correlacionando positivamente entre si os queijos oriundos do PSIM e NSIM, contudo, os queijos NSIM com 14 dias de maturação, se distanciaram dos demais. O dendrograma resultante da análise de agrupamento hierárquico, auxiliou na confirmação dos quatro *clusters* formados (Figura III.5), com coeficiente de correlação cofenético entre a matriz de similaridade e a matriz de agrupamento igual a 0,92, evidenciando alta consistência dos grupamentos gerados.

O primeiro componente principal (CP1) teve como variáveis mais importantes, com altas correlações ($> 0,80$), os aminoácidos (fenilalanina, isoleucina, leucina, lisina, metionina e ornitina), e as aminas bioativas (putrescina e tiramina), extensão e profundidade da proteólise, proteína, sólidos totais e correlação negativa com a umidade (0,97), associados aos queijos (PSIM e NSIM) maturados com 60 dias (Figura III.5C). Estes resultados são concordantes com a tendência observada a partir da análise univariada, realizada anteriormente. Destaca-se a influência direta da maturação nas características físico-químicas do queijo, com aumento no teor de aminoácidos livres e aminas bioativas, provocada pela proteólise.

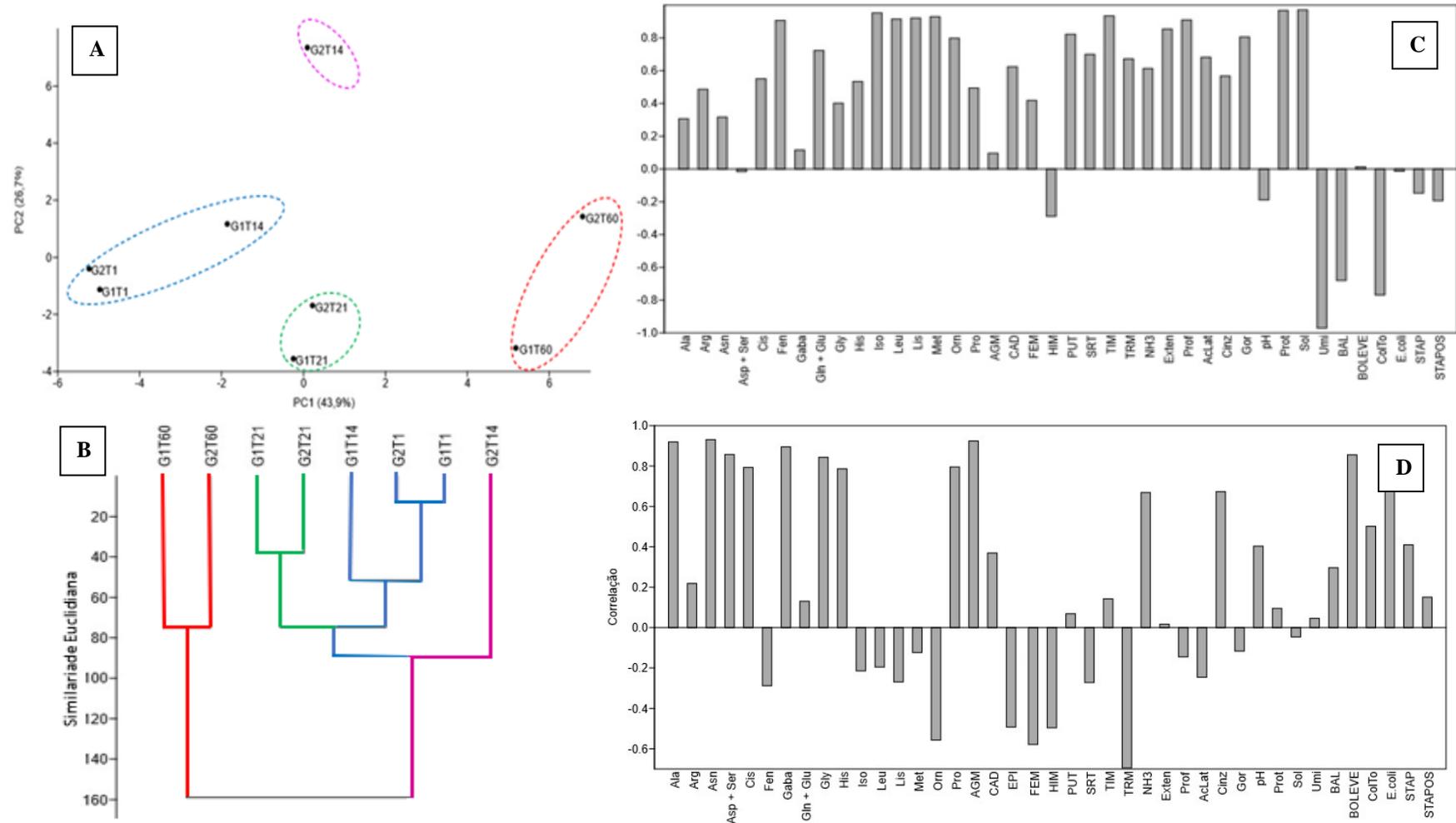


Figura III.5. (A) Projeção das características físico-químicas, microbiológicas, índices de proteólise, perfil de aminoácidos livres e aminas bioativas dos dois grupos de produtores de queijo artesanal da Serra Geral-MG (PSIM e NSIM), durante 60 dias de maturação, obtida pela análise de componentes principais; (B) Dendograma obtido pelo método hierárquico, para os dois grupos de produtores de queijo artesanal da Serra Geral-MG (PSIM e NSIM) durante 60 dias de maturação; (C) *Loadings* de CP1; (D) *Loadings* de CP2.

Não houve relevância dos dados microbiológicos para definição das características dos queijos PSIM e NSIM com 60 dias de maturação, justificado pela redução das contagens microbianas, principalmente de coliformes totais, *E. coli*, *Staphylococcus* coagulase positivo e BAL, ocorrida durante essa etapa. As condições intrínsecas estabelecidas no queijo maturado, como pH, atividade de água, concentração salina, produção de compostos antimicrobianos, competição por nutrientes, promovem a limitação da permanência e multiplicação de alguns microrganismos (ÖZOGUL e HAMED, 2018).

O segundo componente principal (CP2), foi explicado principalmente pelos aminoácidos alanina, asparagina, serina + ácido aspártico, GABA, glicina, pela amina agmatina e pelos parâmetros microbiológicos, bolores e leveduras e *E. coli*, com todas as variáveis apresentando correlações superiores a 0,80. A maior correlação negativa foi para a amina biogênica triptamina (Figura III.5D). O queijo NSIM com 14 dias de maturação teve maior associação com o CP2, diferindo dos outros grupos formados. Essa discriminação indica fortemente a influência das características microbiológicas para definir os queijos NSIM, por apresentar, além de contagens elevadas, ausência de redução ao longo da maturação.

No queijo artesanal da Serra Geral fresco, pertencente aos produtores PSIM e NSIM, é observada pouca influência do CP1 e CP2, ficando posicionado em lado oposto aos queijos com 60 dias de maturação. No entanto, esse comportamento restrito, avaliado por meio da análise multivariada associada a determinadas variáveis no queijo recém-processado, não descarta a importância das características para formação de substâncias precursoras, responsáveis pela definição do queijo maturado. O posicionamento dos queijos com 21 dias de maturação próximo ao eixo central do PC1 justifica o tempo intermediário da etapa, de acordo com o período pesquisado, inferindo sobre as modificações ocorrentes, sem acentuar atributos, como observado nos queijos maturados com 60 dias.

É importante inferir que o tempo de maturação é determinante para a manifestação das características do queijo artesanal da Serra Geral-MG, quanto as propriedades físico-químicas, proteólise, perfil de aminoácidos livres e aminas bioativas, que se intensificam com 60 dias de maturação, levando a diferenciação dos *clusters* composto pelo queijo fresco, com 14 e 21 dias de maturação. Os queijos oriundos do NSIM, maturados com 14 dias, apresentam características definidas pelos dados microbiológicos, inferindo sobre as contaminações do alimento.

4. CONCLUSÃO

Queijos artesanais da Serra Geral-MG produzidos em Porteirinha e oriundos de propriedades sob o serviço de inspeção municipal apresentaram melhor qualidade higiênico-sanitária quando comparados aos queijos oriundos de propriedades sem inspeção. A maturação dos queijos foi eficiente em reduzir as contagens de coliformes totais, *Escherichia coli* e *Staphylococcus* coagulase positivo. O tempo mínimo necessário para o queijo artesanal da Serra Geral-MG atender os padrões microbiológicos exigidos pela legislação seria de 21 dias de maturação para os produtores que possuem o serviço de inspeção municipal, entretanto, os queijos provenientes de queijarias sem inspeção, não alcançaram os valores microbianos limites durante os 60 dias de maturação. Os queijos da região a partir de 21 até 60 dias de maturação, foram classificados como gordo, com baixo teor de umidade, seco e de massa dura.

Os diferentes processos produtivos que originam os queijos estudados estabelecem condições para definir uma microbiota ácido-lática. Foram isolados *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus paracasei*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactococcus lactis*, *Leuconostoc pseudomesenteroides* e *Pediococcus pentosaceus* no queijo fresco e maturado de propriedades sob inspeção municipal, ao longo de 60 dias. Em relação aos queijos oriundos das propriedades sem inspeção, no mesmo período, foi identificado um perfil composto por *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus paracasei*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactococcus garvieae*, *Lactococcus lactis*, *Pediococcus pentosaceus*.

No leite que serviu de matéria-prima para produção dos queijos artesanais da Serra Geral foram identificados baixos teores de aminoácidos livres e um perfil de aminas bioativas representado por histamina, putrescina e tiramina, sendo a primeira, a amina prevalente. O índice de proteólise, os aminoácidos livres e as aminas bioativas aumentaram ao longo da maturação de 60 dias do queijo, podendo ser considerado seguro para pessoas saudáveis. Entretanto, considerando as concentrações de tiramina e histamina, há risco de consumo por indivíduos sensíveis aos efeitos adversos a essas aminas.

CAPÍTULO IV

RECONHECIMENTO DA REGIÃO DA SERRA GERAL-MG COMO PRODUTORA DE QUEIJO ARTESANAL: TRADIÇÃO E DESAFIOS

1. INTRODUÇÃO

A produção do queijo artesanal em Minas Gerais constitui um traço marcante da identidade cultural das regiões produtoras. O queijo do estado é um dos mais antigos e tradicionais, produzidos com atributos únicos que o diferencia de outros produzidos no país. Mesmo tendo essa notoriedade e aumento do número de regiões produtoras de queijos artesanais mineiros, legalmente reconhecidos, a informalidade na cadeia parece ser recorrente.

Atualmente, apenas 209 queijarias, todas produtoras de queijo Minas artesanal (QMA) são cadastradas no âmbito estadual (Instituto Mineiro de Agropecuária - IMA). Há também 40 propriedades registradas com “Selo Arte” (IMA, 2021b). Tal selo permite a comercialização dos queijos artesanais, em todo território nacional, sendo estes submetidos a inspeção e a fiscalização prioritariamente de natureza orientadora (BRASIL, 2018). Considerando o montante de 482 queijarias existentes, somente na região da Serra Geral-MG, ressalta-se a disparidade e contraposição no cenário (EMATER, 2020).

A atividade queijeira artesanal na região da Serra Geral-MG é constituída por propriedades que não estão, em sua maioria, ligadas a órgãos de inspeção, nem tão pouco, obedecem a um processo de produção padronizado, o que resulta em oferta de queijos diferentes, a partir da origem da matéria-prima, adição de pingo, utilização da etapa de maturação, filagem e cozimento da massa. Além disso, o queijo não apresenta uma receita centenária. Em algumas circunstâncias, a produção acontecia de forma caseira, para o consumo da própria família. Porém essa atividade foi adaptada e tornou-se oportunidade de geração de renda. Atualmente, são produzidos diariamente na região, 15.000 peças de queijos, com movimentação financeira em torno de R\$ 195.000 (EMATER, 2020).

Diante das adversidades do setor, cabe destacar o importante papel de políticas públicas que priorizem a diversidade de queijos existentes, criem alternativas de sobrevivência e, sobretudo, estabeleçam melhorias da qualidade e segurança do leite e do queijo artesanal, com ações diligentes, sem adoção de práticas limitantes e rígidas, favorecendo a expressão da singularidade de cada região e, conseqüentemente, de cada queijo.

Assim, considerando a importância econômica e social, bem como a necessidade de conhecimento das particularidades locais, objetivou-se identificar as características e condições de produção do queijo da Serra Geral-MG visando o estabelecimento de medidas de adequações e desenvolvimento das queijarias artesanais.

2. MATERIAL E MÉTODOS

A coleta de informações foi realizada a partir de visitas a 11 queijarias da Serra Geral-MG, distribuídas no município de Porteirinha-MG. Para analisar as condições das unidades de produção, foi realizada, por meio de registro visual, a caracterização do espaço físico e o processo de elaboração dos queijos artesanais.

As visitas às propriedades ocorreram nos meses de março e abril de 2020, com a colaboração da Universidade Estadual de Montes Claros (UNIMONTES), do agente de extensão da Empresa de Assistência Técnica e Extensão Rural (EMATER) e do médico veterinário responsável pelo serviço de inspeção do município.

Nessa oportunidade, para cada produtor de queijo, foram entregues e discutidos, laudos individuais constando as características da água, pingo, leite, queijo fresco e maturado com 14, 21 e 60 dias (Anexo I), obtidos a partir de análises realizadas e apresentadas nos Capítulos II e III). Após a análise dos dados, foi realizada reunião, para que de forma conjunta, também fossem discutidos os resultados com toda a equipe, incluindo os produtores de queijos envolvidos na pesquisa.

A análise dos resultados foi agrupada em tópicos envolvendo as instalações das queijarias, o processo produtivo e a comercialização dos queijos.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Instalações das queijarias

Foram identificadas queijarias localizadas próximas da casa sede, sem focos de insalubridade nas adjacências, construídas em alvenaria, com piso de cerâmica, paredes revestidas de azulejos (algumas apenas com revestimentos até a metade) e tetos com coberturas internas. As queijarias eram dotadas de funil de passagem do leite, acoplados de tecidos coadores para filtragem da matéria-prima na entrada da sala produtora. Em substituição aos

tanques de recepção do leite, foi constatada a utilização de caixas d'água de polietileno, que também são empregadas na etapa de coagulação da massa onde se inicia a fabricação do queijo. As mesas utilizadas para enformagem e dessoragem são de aço inox e ardósia, não possuindo canaleta para o escoamento do pingo. As propriedades que incorporam o soro-fermento no queijo, o recolhem em bandejas de polietileno que são posicionadas sob as formas redondas comuns, teladas no fundo e com furos laterais para dessoragem do queijo.

Baseado no exposto, a maioria das unidades de produção de queijo da região da Serra Geral-MG visitadas apresentavam estruturas básicas de acordo com o que é exigido quanto aos itens destacados (Figura IV.1). Na legislação consta que as instalações das queijarias devem obedecer a preceitos mínimos de construção, equipamentos e higiene, considerando as boas práticas de fabricação, podendo ser contígua à residência, desde que haja delimitação física e inexista comunicação direta (MINAS GERAIS, 2020). A lei exige ainda, que o material utilizado para o revestimento da queijaria seja lavável, de fácil limpeza e desinfecção. O teto pode ser revestido com material que impeça o acúmulo de sujeira, sendo permitido o revestimento com forro de policloreto de vinila (PVC). Todos os equipamentos e utensílios utilizados deverão ser constituídos de material aprovado pelo IMA, estar em bom estado de conservação e de fácil higienização.

Porém, foi observado que ainda persistem alguns entraves na produção do queijo artesanal da Serra Geral-MG. Considerando que a prática de maturar o queijo é recente, em algumas unidades, não existe sala específica que atenda essa etapa, ficando alocadas as prateleiras de madeira, na sala de produção (Figura IV.1). Segundo a legislação vigente (MINAS GERAIS, 2020) é necessário um ambiente específico para essa finalidade, com delimitação das instalações, de forma que não ocorra o contato indevido da matéria-prima e do produto durante a elaboração do queijo (Tabela IV.1). É importante que o *layout* da queijaria siga um fluxo lógico, sem retrocessos, evitando contaminação cruzada do produto.

Outro ponto observado foi a falta de barreiras sanitárias, que devem ser posicionadas, de forma que, realmente, previna a contaminação do ambiente pela entrada de pessoas. O ambiente deverá abrigar lavador de botas, pia, escovas, sabão líquido, sanitizante, toalhas descartáveis e recipiente coletor de papel. Ainda foi constatada a falta de utilização de equipamentos de proteção individual (EPI), por algumas pessoas envolvidas na produção de queijo. Todos que trabalham na manipulação deverão usar indumentária adequada às suas atividades, como roupa protetora branca, botas brancas, máscara para boca e nariz e touca protetora, laváveis ou descartáveis (EMATER, 2009).



Fonte: Arquivo pessoal

Figura IV.1 – Características das unidade produtoras e do queijo artesanal da Serra Geral-MG. (A) queijaria próxima a casa sede; (B) Caixa de polietileno para o processamento do queijo; (C) e (D) Mesas de ardósia utilizadas na etapa de enformagem e dessoragem do queijo; (E) prateleiras de maturação alocadas na sala de produção; (F) queijo fresco, semelhante ao QMA, em etapa inicial da maturação.

Apesar de haver orientação técnica e conhecimento da importância do uso de EPI, é possível notar resistência e até falta de compromisso, por parte de alguns produtores, quanto a esse quesito.

Para minimizar os danos que envolvem o processo produtivo e, conseqüentemente, melhorar a qualidade do queijo da Serra Geral-MG, é imprescindível que continuem os acompanhamentos técnicos, assistindo de forma incisiva os produtores e, que de forma expansiva, possam atingir outros municípios pertencentes a região.

3.2. Processo produtivo

Constatou-se que o leite utilizado como matéria-prima para a produção do queijo artesanal da Serra Geral-MG é um dos grandes desafios a serem enfrentados. Este fato está associado a produtores que fazem a compra de leite de diferentes origens para o processamento do queijo, não possuindo rebanho próprio para subsidiar a produção. Essa situação é tradicional na região e, conforme constatado em observação a campo, alguns produtores fazem a aquisição de leite de vários fornecedores, chegando a receber o leite de 30 propriedades diferentes, sem o devido controle sanitário. Essas queijarias precisam se adequar como agroindústria, devendo o leite ser submetido ao tratamento térmico e o estabelecimento adaptado com caldeiras, pasteurizadores e cadeia do frio, seguindo todos os protocolos conforme exigências legais (Tabela IV.I).

O alto índice de não conformidades dos parâmetros microbiológicos no leite utilizado como matéria-prima para o queijo da Serra Geral-MG (Capítulo II) está, provavelmente, associado a essa forma de captação, que impossibilita o produtor de queijo, controlar as práticas de higiene na ordenha, durante a obtenção do leite. Mudanças de procedimentos deverão ser adotadas, podendo destacar ainda, o controle dos seguintes aspectos: saúde da vaca em lactação, qualidade da água utilizada na ordenha, desinfecção dos tetos antes e após a ordenha, mãos limpas do ordenhador, manutenção, limpeza e desinfecção dos equipamentos de ordenha, utensílios, latões e baldes.

Em contrapartida, também foram detectadas queijarias estruturadas, em condições ideais para o processamento que utilizam leite fornecido por um ou dois produtores e que, inclusive, fazem o pagamento diferenciado por considerar, de forma empírica, ser um produto de melhor qualidade. A legislação mais recente permite que o leite seja fornecido por outra propriedade, desde que seja constatada a qualidade sanitária, emitida pela entidade de controle

competente, que ateste o relacionamento entre o produtor de leite e a queijaria (MINAS GERAIS, 2020). Dessa forma, o órgão responsável pela situação, provavelmente, deverá impor limite no número de propriedades fornecedoras de leite, distância entre as propriedades (fazenda e queijaria), limite de tempo entre a ordenha até entrega ou recepção do leite, limite de temperatura, entre outros.

Tabela IV.1. Inadequações identificadas na produção artesanal do queijo da Serra Geral-MG

Itens não conformes*	Orientações/Exigências**
Ausência de sala específica para maturar o queijo	Maturação: etapa do processo de produção do queijo, na qual ocorrem alterações físicas, químicas e sensoriais relacionadas ao processo de amadurecimento, e necessárias para a definição da identidade do produto, sendo necessária uma área específica para essa finalidade.
Ausência de barreira sanitária	Local destinado à higienização das mãos e botas dos colaboradores devendo estar localizada na área de acesso ao setor de produção.
Não utilização de EPI	Recomenda-se a utilização de roupa protetora branca, botas brancas, máscara para boca e nariz e touca protetora, laváveis ou descartáveis.
Captação do leite de várias propriedades	Apesar da legislação permitir que o leite utilizado na fabricação do queijo seja fornecido por outra propriedade, deve ser constatada, a partir de análises, a qualidade sanitária da matéria-prima recebida, além de ser definido limite no número de propriedades fornecedoras, tempo entre ordenha e produção do queijo e aferimento de temperatura.
Utilização do pingo	A legislação para queijos artesanais, não determina parâmetros para o pingo, entretanto, o conhecimento das características desse soro-fermento é primordial para a qualidade do queijo. O produto deve ser obtido após a etapa da salga e mantido à temperatura ambiente até o momento da produção do queijo no dia seguinte.

EPI = equipamento de proteção individual. *Deve-se destacar que os apontamentos realizados na presente pesquisa, não excluem outras necessidades de adequação. Trabalhos futuros deverão ser realizados, com intuito de obter observações mais abrangentes, em todo o território da Serra Geral-MG;

**Decreto Estadual nº 48.024 (MINAS GERAIS, 2020).

Tendo em vista que o leite utilizado na queijaria deve ser proveniente de rebanho sadio, oriundo de animais que não apresentem sinais clínicos de doenças infectocontagiosas e cujos testes oficiais de zoonoses apresentem resultados negativos, um trabalho de conscientização e orientação técnica deve ser desenvolvido e implantado pelos produtores de leite. Vale ressaltar que consta na lei a obrigatoriedade, de cumprimento do calendário de vacinação, aplicação do teste da caneca telada para diagnóstico da mastite, de forma rotineira, com afastamento da ordenha, as vacas que apresentarem o teste positivo, respeitando também o tempo de carência dos medicamentos (MINAS GERAIS, 2020).

Sobre o soro-fermento utilizado por parte dos produtores de queijo da Serra Geral-MG, foi verificada a inexperiência na obtenção e acondicionamento desse insumo. Esse fato se deve, provavelmente, à prática recente de utilização do fermento natural na região, sendo possível constatar visualmente produtos com diferentes características, variando a coloração e fluidez, além das propriedades físico-químicas e microbiológicas (Capítulo II). Segundo Nobrega et al. (2008), as etapas que antecedem a coleta do pingo influenciam diretamente na sua qualidade. O produto deve ser obtido após a adição de sal (grosso ou refinado) e mantido à temperatura ambiente até o momento da produção do queijo no dia seguinte. Essa forma de obtenção favorece a seleção de bactérias ácido-láticas, que irão desenvolver características típicas do queijo de cada região.

3.3 Comercialização

A maior parte da produção do queijo artesanal da Serra Geral-MG é destinada para o estado de São Paulo, via atravessadores, que compram os queijos diretamente nas propriedades e os transportam ilegalmente pelas fronteiras municipais e estaduais, em veículos de carrocerias fechadas, e em alguns casos, carrocerias isotérmicas. Segundo Santos et al. (2016), os canais de comercialização acessados pelos produtores são diversos e emergem de acordo com as condições individuais. Tais estratégias foram construídas ao longo do tempo, consolidando-se após sofrerem o estigma da clandestinidade, ou seja, após a publicação do RIISPOA no ano de 1950, quando foi instituída a legislação que rege os produtos de origem animal, no Brasil (BRASIL, 1952).

No que se refere ao transporte dos queijos, a legislação estabelece que este, seja realizado em veículo adequado, não havendo menção do limite de temperatura, sendo realizado de forma organizada, de modo a preservar as condições tecnológicas e higiênicas, evitando

contaminação, deformação e quaisquer condições que possam comprometer a qualidade do queijo artesanal (MINAS GERAIS, 2020).

Há muitos relatos de produtores, principalmente de queijos informais, sem inspeção, que manifestam o receio de conquistar novos mercados. A falta de fiscalização nas rodovias promove a comodidade do produtor integrado a esse sistema, que tem como opção a comercialização garantida. Ainda, nesse cenário, o queijeiro não conhece o seu cliente e não estabelece entre si, uma relação de fidelidade, não sendo a qualidade uma ferramenta de diferenciação e referência. Segundo Menezes et al. (2010), a aproximação entre produção e consumo, tem sido pautada como elemento fundamental para a manutenção de laços de confiança entre produtores e consumidores, sendo necessárias, estratégias específicas que apoiem e capacitem os produtores também no setor comercial e econômico.

4. CONCLUSÃO

De forma precursora, essa pesquisa permitiu conhecer a situação da Serra Geral-MG, quanto a produção do queijo artesanal mineiro. Atualmente, existem 482 queijarias, sendo a maioria enquadrada na produção informal, reforçando, dessa forma, a importância de investimentos que promovam uma ação conjunta entre o poder público, universidades, sociedade, produtores de leite e queijo, subsidiando toda a cadeia. Espera-se que esses resultados possam ser utilizados pelos órgãos competentes, na criação de regulamento específico, estimulando e favorecendo a legitimidade da produção artesanal do queijo da Serra Geral-MG.

É importante ressaltar, enfatizando a função de extensão do estudo, que as informações geradas, não ficaram apenas no âmbito acadêmico, foram entregues de forma presencial, a todos os produtores participantes da pesquisa, laudos com resultados individuais, constando as características da água, pingo, leite, queijo fresco e maturado com 14, 21 e 60 dias, além de orientação e auxílio na interpretação dos resultados.

Nota-se que, apesar de existirem regiões consolidadas, com produção e características dos queijos definidas e típicas de uma variedade, o queijo oriundo da Serra Geral-MG não tem como tradição, apenas um produto. Detectou-se a elaboração de derivado lácteo que não deve ser considerado como artesanal, pois apresentam particularidades que contemplam queijos oriundos de agroindústria, principalmente em função do recebimento de matéria-prima de várias origens, com distâncias consideráveis da queijaria, apresentando, dessa forma, a

necessidade de controle no recebimento do leite e, conseqüentemente, pasteurização antes da fabricação do queijo. Entretanto, há produtores em potencial, com expertises na elaboração de queijos que assemelham ao QMA, além de outros queijos, incluindo de massa filada e requeijão moreno.

CONCLUSÕES INTEGRADAS

Queijos artesanais da Serra Geral-MG produzidos em Porteirinha e oriundos de propriedades que possuem o serviço de inspeção municipal apresentaram melhor qualidade higiênico-sanitária quando comparados aos queijos de propriedades sem inspeção salientando a importância da atuação do órgão orientador e fiscalizador, que favorece a oferta de produtos de qualidade, presando a segurança no consumo do queijo.

O tempo mínimo necessário para o queijo artesanal da Serra Geral-MG atender aos padrões microbiológicos exigidos pela legislação seria de 21 dias de maturação para os queijos cujos produtores possuem o serviço de inspeção municipal, entretanto, os queijos provenientes de queijarias sem inspeção, não alcançaram qualidade microbiana satisfatória, durante os 60 dias de maturação. Os queijos da região, a partir de 21 dias, foram classificados como gordo, com baixo teor de umidade, seco e de massa dura.

Os queijos frescos foram enquadrados como gordos e de alta umidade, para ambos os grupos de produtores, contudo, apresentaram risco à saúde do consumidor, associado a qualidade microbiológica deficiente.

A maturação foi uma etapa importante para a garantia da qualidade do queijo artesanal elaborado a partir de leite cru. No entanto, essa prática não deve ser utilizada como alternativa no controle de condições insatisfatórias durante a produção ou até mesmo de contaminações oriundas da água, do pingo e do leite. Reforça-se a importância da aplicação de práticas higiênico-sanitárias ao longo do processo produtivo, para que seja possível mitigar os problemas enfrentados.

A proteólise foi o fenômeno mais importante durante as transformações bioquímicas da maturação. Houve, ao longo de 60 dias dessa etapa, aumento dos índices de extensão e profundidade da proteólise e de teores de aminoácidos e amins bioativas livres.

Lactococcus lactis foi a espécie, das bactérias ácido-láticas, mais frequente no queijo durante a etapa inicial da maturação.

A produção do queijo artesanal tem expressiva importância para a região da Serra Geral-MG e sobretudo, potencial para atingir outros mercados brasileiros. Estudos continuados e articulações com instituições competentes são necessárias para o desenvolvimento e conformidade da produção artesanal do queijo.

REFERÊNCIAS

- ANDRADE, A. P. C.; BORGES, M. F.; FIGUEIREDO, E. A. T.; ARCURI, A. F. Diversity of *Staphylococcus* coagulase positive and negative strains of coalho cheese and detection of enterotoxina. **Boletim do Centro de Pesquisa e Processamento de Alimentos**, Curitiba, v. 36, n. 1, p. 1-9, 2019. Disponível em: <https://revistas.ufpr.br/alimentos/article/view/57553>. Acesso em: 18 fev. 2019.
- ANDRADE, J. N. **Higiene na indústria de alimentos: avaliação e controle da adesão e formação de biofilmes bacterianos**. São Paulo: Varela, 2008.
- ARAÚJO, J. P. A.; CAMARGO, A. C.; CARVALHO, A. F.; NERO, L. A. Uma análise histórico-crítica sobre o desenvolvimento das normas brasileiras relacionadas a queijos artesanais. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 72, n. 5, p. 1845-1860, 2020. Disponível em: <https://www.scielo.br/pdf/abmvz/v72n5/0102-0935-abmvz-72-05-1845.pdf>. Acesso em: 08 fev. 2020.
- ARAÚJO, T. F. **Potencial de aminas bioativas como indicadoras do estágio de maturação e o papel da microbiota endógena do leite cru na inocuidade e características do queijo Minas artesanal**. 2013. Tese (Doutorado em Ciência e Tecnologia de Alimentos)- Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2013. Disponível em: <https://www.locus.ufv.br/handle/123456789/484>. Acesso em: 11 mar. 2020.
- ARDO, Y.; MCSWEENEY, P. L. H.; MAGBOUL, A. A. A.; UPADHYAY, V. K. FOX, P. F. **Biochemistry of cheese ripening: Proteolysis**. Cambridge: Academic Press, 2017. v. 1, p. 445-482.
- ARES-YEBRA, A.; GARABAL, J. I.; CARBALLO, J.; CENTENO, J. A. Formation of conjugated linoleic acid by a *Lactobacillus plantarum* strain isolated from an artisanal cheese: evaluation in miniature cheeses. **International Dairy Journal**, Barking, v. 90, p. 98-103, 2019. Disponível em: <https://www.semanticscholar.org/paper/Formation-of-conjugated-linoleic-acid-by-a-strain-Ares-Yebra-Garabal/dfb3cf09f3001d9ac713aa9643fb42b6748e7165>. Acesso em: 10 fev. 2020.
- ASSIS, G. B. N.; PEREIRA, F. L.; ZEGARRA, A. U.; TAVARES, G. C.; LEAL, C. A. G.; FIGUEIREDO, H. C. P. Use of MALDI-TOF mass spectrometry for the fast identification of gram-positive fish pathogens. **Frontiers in Microbiology**, v.8; n.1492, 2017. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28848512/#:~:text=One%20hundred%20and%20thirty%2D one,MALDI%20Biotyper%20from%20Bruker%20Daltonics.&text=MALDI%2DTOF%20M S%20was%20shown,a%20quick%20and%20precise%20diagnosis>.
- ABIQ. ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DAS INDÚSTRIAS DE QUEIJO. **Queijos no Brasil: cenário atual dos queijos**. Bate-papo com Fábio Scarcelli. 2020. Disponível em: https://www.abiq.com.br/noticias_ler.asp?codigo=2276&codigo_categoria=6&codigo_subcategoria=29. Acesso em: 19 set. 2020.

ASTUTI, M. P. Isolation, characterization, and identification lactic acid bacteria from chicken waste faeces that potential as probiotics. **International Journal of Scientific and Research Publications**, v. 6, n. 5, p. 180-191, 2016. Disponível em: <http://www.ijsrp.org/research-paper-0516/ijsrp-p5332.pdf>. Acesso em: 10 fev. 2020.

AUGUSTO, M. M. M. **Influência do tipo de coagulante e do aquecimento no cozimento da massa na composição, rendimento, proteólise e características sensoriais do queijo prato**. 2003. Tese (Doutorado em Ciência e Tecnologia de Alimentos)-Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2003. Disponível em: <http://repositorio.unicamp.br/jspui/handle/REPOSIP/255804>. Acesso em: 20 fev. 2020.

BALLESTEROS, C.; POVEDA, J. M.; GONZALES-VINAS, M. A.; CABEZAS, L. Microbiological, biochemical and sensory characteristics of artisanal and industrial Manchego cheeses. **Food Control**, Guildford, v. 17, n. 4, p. 249-255, 2006. Disponível em: <https://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=US201301080842>. Acesso em: 14 set. 2020.

BANDEIRA, C. M.; EVANGELISTA, W. P.; GLORIA, M. B. A. Bioactive amines in fresh, canned and dried sweet corn, embryo and endosperm and germinated corn. **Food Chemistry**, London, v. 131, n. 4, p. 1355-1359, 2012. Disponível em: <https://europepmc.org/article/agr/ind500675771>. Acesso em: 20 fev. 2020.

BANJARA, N.; SUHR, M. J.; HALLEN-ADAMS; H. E. Diversity of yeast and mold species from a variety of cheese types. **Current Microbiology**, New York, v. 70, n. 6, p. 792-800, 2015. Disponível em: <https://experts.nebraska.edu/en/publications/diversity-of-yeast-and-mold-species-from-a-variety-of-cheese-type>. Acesso em: 14 set. 2020.

BARONE, C.; BARBERA, M.; BARONE, M.; PARISI, S.; ZACCHEO, A. Biogenic amines in cheeses: types and typical amounts. *In*: BARONE, C.; BARBERA, M.; BARONE, M.; PARISI, S.; ZACCHEO, A. **Chemical Evolution of Nitrogen-based Compounds in Mozzarella Cheeses**. Springer Briefs in Molecular Science, 2018. p. 1-18.

BENKERROUM, N. Biogenic amines in dairy products: origin, incidence, and control means. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 15, p. 801-826, 2016a. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/1541-4337.12212>. Acesso em: 21 mar. 2020.

BENKERROUM, N. Mycotoxins in dairy products: A review. **International Dairy Journal**, Barking, v. 62, p. 63-75, 2016b. Disponível em: <https://europepmc.org/article/AGR/IND605510003>. Acesso em: 12 fev. 2020.

BENNAMOUN, L.; BELHAMRI, A. Numerical simulation of drying under variable external condition: Application to solar dry of seedless grapes. **Journal of Food Engineering**, Essex, v. 76, n. 2, p. 179-187, 2006. Disponível em: <http://www.univ-oeb.dz/bibliotheque/wp-content/uploads/2017/01/Numerical-simulation-of-drying-under-variable-external-conditions.pdf>. Acesso em: 10 mai. 2020.

BERESFORD, T. P.; FITZSIMONS, N. A.; BRENNAN, N. L.; COGAN, T. M. Recent advances in cheese microbiology. **International Dairy Journal**, Barking, v. 11, p. 259-274,

2001. Disponível em:

[https://www.scirp.org/\(S\(czeh2tfqyw2orz553k1w0r45\)\)/reference/ReferencesPapers.aspx?ReferenceID=1592889](https://www.scirp.org/(S(czeh2tfqyw2orz553k1w0r45))/reference/ReferencesPapers.aspx?ReferenceID=1592889). Acesso em: 20 mar. 2020.

BIOLCATI, F.; ANDRIGHETTO, C.; BOTTERO, M. T.; DALMASSO, A. Microbial characterization of an artisanal production of Robioladi Roccaverano cheese. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 103, n. 5, p. 4056-4067, 2020. Disponível em: <https://www.x-mol.com/paper/1238175075010330624>. Acesso em: 10 mar. 2020.

BISCOLA, V.; CHOISSET, Y.; RABESONA, H.; CHOBERT, J. M.; HAERTLÉ, T.; FRANCO, M. B. D. G. Brazilian artisanal ripened cheeses as sources of proteolytic lactic acid bacteria capable to reducing cow milk allergy. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 125, p. 564-574, 2018. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29654625/>. Acesso em: 22 fev. 2020.

BORELLI, B. M. **Caracterização das bactérias lácticas, leveduras e das populações de Staphylococcus enterotoxigênicos durante a fabricação do queijo de minas curado produzido na Serra da Canastra - MG**. 2006. Tese (Doutorado em Microbiologia) - Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2006.

BORGES, M. F.; ARCURI, E. F.; PEREIRA, J. L.; FEITOSA, T.; KUAYE, A. Y. *Staphylococcus* enterotoxigênicos em leite e produtos lácteos, suas enterotoxinas e genes associados: revisão. **Boletim do Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos**, Curitiba, v. 26, n. 1, p. 70-86, 2008. Disponível em: https://www.researchgate.net/publication/228847540_Staphylococcus_ENTEROTOXIGENICOS_EM_LEITE_E_PRODUTOS_LACTEOS_SUAS_ENTEROTOXINAS_E_GENES_AS_SOCIADOS_REVISAO. Acesso em: 20 set. 2020.

BOU, G.; OLMOS, A.F.; GARCIA, C.; NIETO, J.A.S.; VALDEZATE, S. Métodos de identificación bacteriana en el laboratorio de microbiología. **Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica**, v.29, n.8, p.601–608, 2011. Disponível em: <https://www.elsevier.es/es-revista-enfermedades-infecciosas-microbiologia-clinica-28-articulo-metodos-identificacion-bacteriana-el-laboratorio-S0213005X11001571>. Acesso em: 03 mar.2020.

BOVER-CID, S. **Identificación de variables y medidas de control de la acumulación de aminos biogenas em productos carnicos fermentados**. Tesis (Doctorado)-Universitat de Barcelona, España, 2000. Disponível em: <https://dialnet.unirioja.es/servlet/tesis?codigo=235883>. Acesso em: 20 mar. 2020.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 73, de 23 de dezembro de 2019. Estabelecer, em todo o território nacional, o Regulamento Técnico de Boas Práticas Agropecuárias destinadas aos produtores rurais fornecedores de leite para a fabricação de produtos lácteos artesanais, necessárias à concessão do selo ARTE. **Diário Oficial da União**, Brasília, 30 dez. 2019. Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br/>. Acesso em: 2 jul. 2020.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa no 30 de 26 de junho de 2018. Manual de Métodos Oficiais para Análise de Alimentos de Origem Animal. 2018. **Diário Oficial da União**, Brasília, 26 jun. 2018. Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br/>. Acesso em: 5 jul. 2018.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução normativa nº 76, de 26 de novembro de 2018. Regulamentos Técnicos que fixam a identidade e as características de qualidade que devem apresentar o leite cru refrigerado, o leite pasteurizado e o leite pasteurizado tipo A. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 30 de novembro de 2018. Disponível em: https://www.in.gov.br/materia/-/asset_publisher/Kujrw0TZC2Mb/content/id/52750137/do1-2018-11-30-instrucao-normativa-n-76-de-26-de-novembro-de-2018-52749894IN%2076. Acesso em: 20 de jun. 2019.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa no 21, de 31 de maio de 2017. Aprova o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade do Peixe Congelado. **Diário Oficial da União**, seção 1, Brasília, DF, 31 maio 2017. Disponível em: https://www.in.gov.br/materia/-/asset_publisher/Kujrw0TZC2Mb/content/id/19100559/do1-2017-06-07-instrucao-normativa-n-21-de-31-de-maio-de-2017-19100473. Acesso em: 17 fev. 2020.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa MAPA nº 62, de 29 de dezembro de 2011. Aprova o regulamento técnico de produção, identidade e qualidade do leite tipo A, o regulamento técnico de identidade e qualidade de leite cru refrigerado, o regulamento técnico de identidade e qualidade de leite pasteurizado e o regulamento técnico da coleta de leite cru refrigerado e seu transporte a granel. **Diário Oficial da União**, seção 1, Brasília, DF, 30 dez. 2011. Disponível em: https://www.normasbrasil.com.br/norma/instrucao-normativa-62-2011_78285.html. Acesso em: 17 fev. 2020.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 45, de 13 de dezembro de 2011. Aprova o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Conservas de Peixes. **Diário Oficial da União**, seção 1, Brasília, DF, 14 dez. 2011. Disponível em: <http://www.cidasc.sc.gov.br/inspecao/files/2019/01/IN-N%C2%BA-45-2011.pdf>. Acesso: 17 fev. 2020.

BRASIL. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. Instrução Normativa nº 62, de 26 de agosto de 2003. Métodos Analíticos Oficiais Microbiológicos para Análises Microbiológicas para Controle de Produtos de origem Animal e Água. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 18 de setembro de 2003. Disponível em: <https://www.defesa.agricultura.sp.gov.br/legislacoes/instrucao-normativa-sda-62-de-26-08-2003,665.html>. Acesso em: 20 jun. 2019.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Portaria nº 185, de 13 de maio de 1997. Aprova o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Peixe Fresco (Inteiro e Eviscerado). **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 13 maio 1997. Disponível em: https://www.dourados.ms.gov.br/wp-content/uploads/2016/05/RTIQ-Pescado-completo-PORTARIA-185_1997.pdf. Acesso em: 17 fev. 2020.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Portaria nº 146, de 7 de março de 1996. Aprova os Regulamentos Técnicos de Identidade e Qualidade dos Produtos Lácteos. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 11 mar. 1996. Disponível em: <https://www.defesa.agricultura.sp.gov.br/legislacoes/portaria-mapa-146-de-07-03-1996,669.html>. Acesso em: 17 fev. 2020.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Decreto nº 30.691, de 29 de março de 1952. Aprova o novo regulamento da inspeção industrial e sanitária de produtos de origem animal - RIISPOA. **Diário Oficial** dos Estados Unidos do Brasil, Rio de Janeiro, 7 jul. 1952.

BRASIL. Ministério da Saúde. Portaria nº 2.914 de 12 de dezembro de 2011. Dispõe sobre os procedimentos de controle e de vigilância da qualidade da água para consumo humano e seu padrão de potabilidade. **Diário Oficial da União**, seção 1, Brasília, DF, 26 dez. 2011. Disponível em http://portal2.saude.gov.br/saudelegis/leg_norma_pesq_consulta.cfm. Acesso em: 2 jun. 2020.

BRASIL. Secretaria de Políticas e Desenvolvimento Regional. **Nova delimitação do semi-árido brasileiro**. Brasília, DF: Ministério da Integração Nacional, 2005. Disponível em: <http://www.museusemiarido.org.br/expedicao/cartilha-delimitacao-semiarido.pdf>. Acesso em: 2 jun. 2020.

BURNS C.; KIDRON A. **Biochemistry, Tyramine**. Treasure Island (FL): Stat Pearls Publishing, 2020.

CABRAL, M. L. B.; LIMA, M. L. S.; ARAÚJO, G. H.; COSTA, E. F.; PORTO, A. L. F.; CAVALCANTI, M. T. Queijos artesanais fonte de bactérias ácido lácticas selvagens para formulação de fermentos tradicionais. **Journal of Bioenergy and Food Science**, v. 3, n. 4, p. 207-215, 2016. Disponível em: https://www.researchgate.net/publication/312429425_Queijos_artesanais_fonte_de_bacterias_acido_laticas_selvagens_para_formulacao_de_fermentos_tradicionais. Acesso em: 10 fev. 2020.

CAMPAGNOLLO, F. B.; MARGALHO, L. P.; KAMIMURA, B. A.; FELICIANO, M. D.; FREIRE, L.; LOPES, L. S.; ALVARENGA, V. O.; CADAVEZ, V. A. P.; GONZALES-BARRON, U.; SCHAFFNER, D. W.; SANT'ANA, A. S. Selection of indigenous lactic acid bacteria presenting anti-listerial activity, and their role in reducing the maturation period and assuring the safety of traditional Brazilian cheeses. **Food Microbiology**, London, v. 73, p. 288-297, 2018. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29526214/>. Acesso em: 20 mar. 2020.

CAMPOS, G. Z. **Avaliação microbiológica de queijos minas artesanais provenientes da Serra da Canastra durante e após o período de maturação**. 2019. Dissertação (Mestrado em Ciências dos Alimentos)-Universidade de São Paulo, São Paulo, 2019. Disponível em: https://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/9/9131/tde-03122019-125240/publico/Gabriela_Zambieri_Campos_ME_Corrigida.pdf. Acesso em: 10 mar. 2020.

CANGUSSU, R. R. C. **Estudo do tempo mínimo de maturação para segurança do queijo**

Minas artesanal da Serra Geral. 2018. Dissertação (Mestrado em Produção Animal)-Universidade Federal de Minas Gerais, Montes Claros, 2018. Disponível em: <https://repositorio.ufmg.br/handle/1843/NCAP-B45HAA>. Acesso em: 25 mar. 2020.

CARAFÁ, I.; NARDIN, T.; LARCHER, R.; VIOLA, R.; TUOHY, K.; FRANCIOSI, E. Identification and characterization of wild lactobacilli and pediococci from spontaneously fermented Mountain cheese. **Food Microbiology**, London, v. 48, p. 123-132, 2015. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25791000/>. Acesso em: 10 fev. 2020.

CARDOSO, V. M.; BORELLI, B. M.; LARA, C. A.; SOARES, M. A.; PATARO, C.; BODEVAN, E. C.; ROSA, C. A. The influence of seasons and ripening time on yeast communities of a traditional Brazilian cheese. **Food Research International**, Barking, v. 69, p. 331-340, 2015. Disponível em: <https://core.ac.uk/download/pdf/82085507.pdf>. Acesso em: 15 mar. 2020.

CARNEIRO, J. O.; CHAVES, A. C. S. D.; STEPHAN, M. P.; BOARI, C. A.; KOBLITZ, M. G. B. Artisan minas cheese of Serro: proteolysis during ripening. **Heliyon**, v. 6, n. 7, e04446, 2020. Disponível em: https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2405844020312901?dgcid=rss_sd_all. Acesso em: 15 mar. 2020.

CARR, F. J.; CHILL, D.; MAIDA, N. The acid lactic bacteria: a literature survey. **Critical Reviews in Microbiology**, Boca Raton, v. 28, n. 4, p. 281-370, 2002. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12546196/>. Acesso em: 10 fev. 2020.

CARVALHO, M. H. R. **Caracterização de unidades produtoras de leite e queijos informais.** 2018. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Zootecnia)-Universidade Estadual de Montes Claros, Janaúba, 2018.

CASTRO, R. D.; OLIVEIRA, L. G.; SANT'ANNA, F. M.; LUIZ, L. M. P.; SANDES, S. H. C.; SILVA, C. I. F.; SILVA, A. M.; NUNES, A. C.; PENNA, C. F. A. M.; SOUZA, M. R. Lactic acid microbiota identification in water, raw milk, endogenous starter culture, and fresh Minas artisanal cheese from the Campo das Vertentes region of Brazil during the dry and rainy seasons. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 99, n. 8, p. 6086-6096, 2016. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27289151/>. Acesso em: 10 fev. 2020.

CAVANAGH, D.; FITZGERALD, G. F.; MCAULIFFE, O. From field to fermentation: the origins of *Lactococcus lactis* and its domestication to the dairy environment. **Food Microbiology**, London, v. 47, p. 45-61, 2015. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25583337/>. Acesso em: 10 fev. 2020.

CHMIELEWSKI, R. A. N.; FRANK, J. F. Biofilm formation and control in food processing facilities. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 2, p. 22-32, 2003. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/j.1541-4337.2003.tb00012.x>. Acesso em: 10 mar. 2020.

CHONG, C. Y.; BAKAR, F. A.; RAHMAN, R. A.; BAKAR, J.; MAHYUDIN, N. A. The effects of food processing on biogenic amines formation. **International Food Research Journal**, v. 18, n. 3, p. 867-876, 2011. Disponível em:

[http://www.ifrj.upm.edu.my/18%20\(03\)%202011/3\)IFRJ-2010-130.pdf](http://www.ifrj.upm.edu.my/18%20(03)%202011/3)IFRJ-2010-130.pdf). Acesso em: 10 fev. 2020.

CHRISTENSEN, J. E.; DUDLEY, E. G.; PEDERSON, J. A.; STEELE, J. L. Peptidases and amino acid catabolism in lactic acid bacteria. **Antonie van Leeuwenhoek**, Amsterdam, v. 76, n. 1-4, p. 217-246, 1999. Disponível em: <https://pennstate.pure.elsevier.com/en/publications/peptidases-and-amino-acid-catabolism-in-lactic-acid-bacteria>. Acesso em: 5 fev. 2020.

CITADIN, A. S.; POZZA, M. S. S.; POZZA, P. C.; NUNES, R. V.; BORSATTI, L.; MANGONI, J. Qualidade microbiológica de leite cru refrigerado e fatores associados. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, Salvador, v. 10, n. 1, p. 52-59, 2009. Disponível em: <https://periodicos.ufba.br/index.php/rbspa/article/view/39686>. Acesso em: 5 fev. 2020.

CNA. CONFEDERAÇÃO DA AGRICULTURA E PECUÁRIA DO BRASIL. **Queijaria de Porteirinha (MG) conquista selo do IMA e prova que região tem Queijo Minas Artesanal de qualidade**. 2020. Disponível em: <https://www.cnabrazil.org.br/noticias/queijaria-de-porteirinha-mg-conquista-selo-do-ima-e-prova-que-regiao-tem-queijo-minas-artesanal-de-qualidade>. Acesso em: 19 dez. 2020.

COMBARROS-FUERTES, P.; FERNÁNDEZ, D.; ARENAS, R.; DIEZHANDINO, I.; TORNADIJO, M. E.; FRESNO J. M. Biogenic amines in Zamorano cheese: factors involved in their accumulation. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, London, v. 96, p. 295-305, 2015. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25641417/>. Acesso em: 10 fev. 2020.

COSTANZO, N.; CENITI, C.; SANTORO, A.; CLAUSI, M. T.; CASALINUOVO, F. "Foodborne pathogen assessment in raw milk cheeses". **International Journal of Food Science**, Delhi, p. 1-5, 2020. Disponível em: <https://www.hindawi.com/journals/ijfs/2020/3616713/> Acesso em: 09 jan. 2021.

COSTA JÚNIOR, L. C. G.; COSTA, R. G. B.; MAGALHÃES, F. A. R.; VARGAS, P. I. R.; FERNANDES, A. J. M.; PEREIRA, A. S. Variações na composição de queijo Minas artesanal da Serra da Canastra nas quatro estações do ano. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, Juiz de Fora, v. 64, n. 371, p. 13-20, 2009. Disponível em: <https://www.revistadoilct.com.br/rilct/article/view/101>. Acesso em: 10 fev. 2020.

COSTA JÚNIOR, L. C.; MORENO, V. J.; MAGALHÃES, F. A. R.; COSTA, R. G. B.; RESENDE, E. C.; CARVALHO, K. B. A. Maturação do queijo Minas artesanal da microrregião Campo das Vertentes e os efeitos dos períodos seco e chuvoso. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, Juiz de Fora, v. 69, n. 2, p. 111-120, 2014. Disponível em: <https://www.revistadoilct.com.br/rilct/article/view/326/0>. Acesso em: 10 fev. 2020.

COSTA, M. P.; RODRIGUES, B. L.; FRASAO, B. S.; CONTE-JUNIOR, C. A. Biogenic amines as food quality index and chemical risk for human consumption. *In*: GRUMEZESCUAND, A. M.; HOLBAN, A. M. **Food Quality: Balancing Health and Disease**. London, UK: Academic Press, 2018. p. 75-108.

COSTA, W. K. A.; SOUZA, G. T.; BRANDÃO, L. R.; LIMA, R. C.; GARCIA, E. F.; LIMA, M. S.; SOUZA, E. L.; SAARELAD, M.; MAGNANI, M. Exploiting antagonistic activity of fruit-derived *Lactobacillus* to control pathogenic bacteria in fresh cheese and chick meat.

Food Research International, Barking, v. 108, p. 172-182, 2018. Disponível em: <https://europepmc.org/article/med/29735046>. Acesso em: 10 fev. 2020.

COTTER, P. D.; HILL, C. Surviving the acid test: responses of Gram-positive bacteria to low pH. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, New York, v. 67, n. 3, p. 429-445, 2003. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC193868/>. Acesso em: 10 fev. 2020.

CRUZADO-BRAVO, M. L. M.; SILVA, N. C. C.; RODRIGUES, M. X.; SILVA, G. O. E.; PORTO, E.; STURION, G. L. Phenotypic and genotypic characterization of *Staphylococcus* spp. isolated from mastitis milk and cheese processing: Study of adherence and biofilm formation. **Food Research International**, Barking, v. 122, p. 450-460, 2019. Disponível em: <https://europepmc.org/article/med/31229099>. Acesso em: 10 fev. 2020.

DIANA, M.; RAFECAS, M.; ARCO, C.; QUÍLEZ, J. Free amino acid profile of Spanish artisanal cheeses: Importance of gamma-aminobutyric acid (GABA) and ornithine content. **Journal of Food Composition and Analysis**, San Diego, v. 35, n. 2, p. 94-100, 2014.

Disponível em:

https://www.researchgate.net/publication/265338903_Free_amino_acid_profile_of_Spanish_artisanal_cheeses_Importance_of_gamma-aminobutyric_acid_GABA_and_ornithine_content. Acesso em: 10 fev. 2020.

DIAZ, M.; DEL RIO, B.; SANCHEZ-LLANA, E.; LADERO, V.; REDRUELLO, B.; FERNÁNDEZ, M.; MARTIN, M. C.; ALVAREZ, M. A. *Lactobacillus* parabuchneri produces histamine in refrigerated cheese at a temperature-dependent rate. **International Journal of Food Science and Technology**, Oxford, v. 53, n. 10, p. 2342-2348, 2018.

Disponível em:

https://digital.csic.es/bitstream/10261/185981/3/Lactobacillus_parabuchneri.pdf. Acesso em: 20 mar. 2020.

DOEUN, D.; DAVAATSEREN, M.; CHUNG, M. S. Biogenic amines in foods. **Food Science and Biotechnology**, v. 26, n. 6, p. 1463-1474, 2017. Disponível em:

<https://link.springer.com/article/10.1007/s10068-017-0239-3?shared-article-renderer>. Acesso em: 10 fev. 2020.

DOMINGOS-LOPES, M. F. P.; STANTON, C.; ROSS P. R.; DAPKEVICIUS, M. L. E.; SILVA, C. C. G. Genetic diversity, safety and technological characterization of lactic acid bacteria isolated from artisanal Pico cheese. **Food Microbiology**, London, v. 63, p. 178-190, 2017. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28040167/>. Acesso em: 10 fev. 2020.

DORES, M. T.; NOBREGA, J. E.; FERREIRA, C. L. L. F. Room temperature aging to guarantee microbiological safety of brazilian artisan Canastra cheese. **Food Science and Technology**, London, v. 33, n. 1, p. 180-185, 2013. Disponível em:

https://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0101-20612013000100026. Acesso em: 10 fev. 2020.

DUPIN, L. V. “Eu sou parte de uma classe de produtores que perdeu a sabedoria lá de trás e começou a pisar dentro das tecnologias’: trajetórias camponesas na fabricação de queijos artesanais em Minas Gerais”. **Antípoda. Revista de Antropología y Arqueología**, Bogotá, v. 40, p. 153-173, 2020. Disponível em: http://www.scielo.org.co/scielo.php?pid=S1900-54072020000300153&script=sci_abstract&tlng=en. Acesso em: 10 mar. 2020.

DURAK-DADOS, A.; MICHALSKI, M.; OSEK, J. Histamine and other biogenic amines in food. **Journal of Veterinary Research**, Pulawy, v. 64, n. 2, p. 281-288, 2020. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7305651/>. Acesso em: 20 mar. 2020.

ECKERSALL, P. D.; YOUNG, F. J.; NOLAN, A. M.; KNIGHT, C. H.; MCCOMB, C.; WATERSTON, M. M.; HOGARTH, C. J.; SCOTT, E. M.; FITZPATRICK, J. L. Acute phase proteins in bovine milk in an experimental model of *Staphylococcus aureus* subclinical mastitis. **Journal of Dairy Science**, v.89, p. 1488-1501, 2006. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0022030206722160>. Acesso em: 10 mar. 2020.

EFSA. EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY. Scientific opinion on risk based control of biogenic amine formation in fermented foods. **EFSA Journal**, v. 9, n. 10, p. 2392, 2011. Disponível em: <https://www.efsa.europa.eu/en/efsajournal/pub/2393>. Acesso em: 20 mar. 2020.

EMATER. EMPRESA DE ASSISTÊNCIA TÉCNICA E EXTENSÃO RURAL DO ESTADO DE MINAS GERAIS. **Levantamento das agroindústrias familiares de Minas Gerais**. 2021. Disponível em: https://www.emater.mg.gov.br/portal.do/site-noticias/emater-mg-faz-levantamento-das-agroindustrias-familiares-de-minas-gerais/?flagweb=novosite_pagina_interna&id=25374. Acesso em: 5 fev.2021.

EMATER. EMPRESA DE ASSISTÊNCIA TÉCNICA E EXTENSÃO RURAL DO ESTADO DE MINAS GERAIS. **Solicitação de apoio a situação produção e venda do queijo e do leite na região da Serra Geral de Minas**. Documento interno. 2020.

EMATER. EMPRESA DE ASSISTÊNCIA TÉCNICA E EXTENSÃO RURAL DO ESTADO DE MINAS GERAIS. **Caracterização integrada de municípios da região da Serra Geral do Norte de Minas como produtora de queijo artesanal**. 2018. Disponível em: http://www.emater.mg.gov.br/portal.do/site-noticias/estudo-identifica-municipios-da-serra-geral-como-produtores-tradicionais-de-queijo-artesanal/?flagweb=novosite_pagina_interna&id=22614. Acesso em: 20 fev. 2020.

EMPRESA DE ASSISTÊNCIA TÉCNICA E EXTENSÃO RURAL DE MINAS GERAIS (EMATER). Programa do Queijo Minas Artesanal, 2014. Disponível em: <http://www.emater.mg.gov.br>. Acesso em: 05 mai. 2017.

EMATER. EMPRESA DE ASSISTÊNCIA TÉCNICA E EXTENSÃO RURAL DO ESTADO DE MINAS GERAIS. Queijo Minas Artesanal. 2009. Disponível em: https://www.emater.mg.gov.br/doc/intranet/upload/QUEIJO_SITE/cartilha_queijo%202.pdf. Acesso em: 19 jun. 2018.

ENGELS, W. J. M.; DEKKER, R.; JONG, C.; NEETER, R.; VISSER, S. A comparative study of volatile compounds in the water soluble fraction of various types of ripened cheese. **International Dairy Journal**, Barking, v.7, n. 4, p. 255-263, 1997. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0958694697000034>. Acesso em: 25 mar. 2020.

EPAMIG. EMPRESA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA DE MINAS GERAIS. **Queijo minas artesanal: principais problemas de fabricação: manual técnico de orientação ao produtor**. Belo Horizonte: EPAMIG, 2019. Disponível em: <http://www.epamig.br/download/queijo-minas-artesanal-principais-problemas-de-fabricacao/>. Acesso em: 20 fev. 2020.

ESPINOSA-PESQUEIRA, D.; HERNÁNDEZ-HERRERO, M. M.; ROIG-SAGUÉS, A. X. High hydrostatic pressure as a tool to reduce formation of biogenic amines in artisanal Spanish cheeses. **Foods**, v. 7, n. 9, p. 1-15, 2018. Disponível em: https://www.researchgate.net/publication/327333980_High_Hydrostatic_Pressure_as_a_Tool_to_Reduce_Formation_of_Biogenic_Amines_in_Artisanal_Spanish_Cheeses. Acesso em: 10 fev. 2020.

FENNEMA, O. R.; DAMODARAN, S.; PARKIN, K. L. **Química de Alimentos de Fennema**. 4. ed. Porto Alegre: Artmed, 2010.

FERNANDEZ, E.; ALEGRIA, A.; DELGADO, S.; MAYO, B. Phenotypic, genetic and technological characterization of *Lactococcus garvieae* strains isolated from a raw milk cheese. **International Dairy Journal**, Barking, v. 20, n. 3, p. 142-148, 2010. Disponível em: <https://digital.csic.es/handle/10261/51541>. Acesso em: 15 fev. 2020.

FERNÁNDEZ, M.; LINARES, D. M.; ÁLVAREZ, M. A. Sequencing of the tyrosine decarboxylase cluster of *Lactococcus lactis* IPLA 655 and the development of a PCR method for detecting tyrosine decarboxylating lactic acid bacteria. **Journal of Food Protection**, Ames, v. 67, n. 11, p. 2521-2529, 2004. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15553636/>. Acesso em: 15 fev. 2020.

FERREIRA, H. R.; TRES, A.; TETTO, A. F.; SOARES, R. V.; WENDLING, W. T.; BATISTA, A. C. Classificação climática para o estado de Minas Gerais segundo as zonas de vida de Holdridge. **Journal of Biotechnology and Biodiversity**, v. 7, n. 2, p. 257-264, 2019. Disponível em: <https://sistemas.uft.edu.br/periodicos/index.php/JBB/article/view/7431>. Acesso em: 15 fev. 2020.

FIECHTER, G.; SIVEC, G.; MAYER, H. K. Application of UHPLC for the simultaneous analysis of free amino acids and biogenic amines in ripened acid-curd cheeses. **Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, Amsterdam, v. 927, p. 191-200, 2013. Disponível em: <https://europepmc.org/article/med/23294548>. Acesso em: 15 fev. 2020.

FIGUEIREDO, R. C. **Perfil socioeconômico de agricultores familiares e caracterização de queijo Minas artesanal de Serra do Salitre (MG) em diferentes períodos de maturação e épocas do ano**. 2018. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal)-Universidade Federal de

Minas Gerais, Belo Horizonte, 2018. Disponível em:
<https://repositorio.ufmg.br/handle/1843/SMOC-B6GP5C>. Acesso em: 15 fev. 2020.

FDA. FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. **Foodborne Pathogenic Microorganisms and Natural Toxins Handbook**. Rockville, Maryland: Center for Food Safety and Applied Nutrition, 1992.

FOOD STANDARDS. **Microbiological Risk Assessment of Raw Milk Cheese**. New Zealand, Australia: Risk Assessment Microbiology Section, 2009.

FOX, P. F.; GUINEE T. P.; COGAN, T. M.; MCSWEENEY, P. L. H. Biochemistry of Cheese Ripening. *In*: FOX, P. F.; GUINEE T. P.; COGAN, T. M.; MCSWEENEY, P. L. H. **Fundamentals of Cheese Science**. Boston, MA: Food Science & Nutrition, 2017. cap. 11. p. 391-442.

FOX, P. F.; GUINEE, T. P.; COGAN, T. M.; MCSWEENEY, P. L. H. **Fundamentals of Cheese Science**. Gaithersburg, MD: Aspen Publishers, 2000.

FRANCESCHI, P.; MALACARNE, M.; FORMAGGIONI, P.; RIGHI, F.; SUMMER, A. Chemical composition, hygiene characteristics, and coagulation aptitude of milk for Parmigiano Reggiano cheese from herds yielding different milk levels. **Revista Brasileira de Zootecnia**, 2020, v. 49, e20180113. Disponível em:
<https://www.scielo.br/j/rbz/a/rwn565TZ3S9yJnbZnFWCyCN/?lang=en>. Acesso em: 20 jan. 2021.

GALITSOPOULOU, A.; MICHAELIDOU, A. M.; MENEXES, G.; ALICHANIDIS, E. Polyamine profile in ovine and caprine colostrum and milk. **Food Chemistry**, London, v. 173, p. 80-85, 2015. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25465997/>. Acesso em: 15 fev. 2020.

GIORGIO, D.; DI TRANA, A.; SALVATORE, C. Oligosaccharides, polyamines and sphingolipids in ruminant milk. **Small Ruminant Research**, Amsterdam, v. 160, p. 23-30, 2018. Disponível em: <https://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=US201900223654>. Acesso em: 20 mar. 2020.

GLORIA, M. B. A. Bioactive Amines. *In*: HUI, H.; NOLLET, L. (Eds.). **Handbook of Food Science, Technology and Engineering**. v. 1. New York: Taylor & Francis, 2005. p. 13-32.

GLORIA, M. B. A.; SARAIVA, P. R.; RIGUEIRA, J. C. S.; BRANDÃO, S. C. C. Bioactive amines changes in raw and sterilised milk inoculated with *Pseudomonas fluorescens* stored at different temperatures. **International Journal of Dairy Technology**, Huntingdon, v. 64, n. 1, p. 45-51, 2011. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/j.1471-0307.2010.00637.x>. Acesso em: 10 fev. 2020.

GLORIA, M. B. A.; VIEIRA, S. M. Technological and toxicological significance of bioactive amines in grapes and wines. **Food Science**, Shannon, v. 1, n. 2, p. 258-270, 2007. Disponível em:
[http://www.globalsciencebooks.info/Online/GSBOonline/images/0712/FOOD_1\(2\)/FOOD_1\(2\)258-270o.pdf](http://www.globalsciencebooks.info/Online/GSBOonline/images/0712/FOOD_1(2)/FOOD_1(2)258-270o.pdf). Acesso em: 10 fev. 2020.

HADDADI, K.; MOUSSAOUI, F.; HEBIA, I.; LAURENT, F.; LE ROUX, Y. E. coli proteolytic activity in milk and casein breakdown. **Reproduction Nutrition Development**, Paris, v. 45, n. 4, p. 485-496, 2005. Disponível em: <https://hal.archives-ouvertes.fr/hal-00900571/document>. Acesso em: 10 fev. 2020.

HAMMAD, A.; HASSAN, H. A.; SHIMAMOTO, T. Prevalence, antibiotic resistance and virulence of Enterococcus spp. in Egyptian fresh raw milk cheese. **Food Control**, Guildford, v. 50, p. 815-820, 2015. Disponível em: https://www.researchgate.net/publication/280286547_Prevalence_antibiotic_resistance_and_virulence_of_Enterococcus_spp_in_Egyptian_fresh_raw_milk_cheese. Acesso em: 10 fev. 2020.

HAMMET, A.M.; HASSAN, H.A.; SHIMAMOTO, T. Prevalence, antibiotic resistance and virulence of Enterococcus spp. in Egyptian fresh raw milk cheese. **Food Control**, v.50, p.815–820, 2015. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0956713514006021>. Acesso em: 09 mar. 2020.

HANDA, A. K.; FATIMA, T.; MATTOO, A. K. Polyamines: Bio-Molecules with Diverse Functions in Plant and Human Health and Disease. **Frontiers in Chemistry**, v. 6, n. 10, 2018. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29468148/>. Acesso em: 10 fev. 2020.

HEREDIA-CASTRO, P. Y.; HÉRNÁNDEZ-MENDOZA, A.; GONZÁLEZ-CÓRDOVA, A. F.; VALLEJO-CORDOBA, B. Bacteriocinas de bacterias ácido lácticas: mecanismos de acción y actividad antimicrobiana contra patógenos em quesos. **Interciencia**, Caracas, v. 42, n. 6, p. 340-346, 2017. Disponível em: <https://www.redalyc.org/pdf/339/33951621002.pdf>. Acesso em: 10 fev. 2020.

HEREDIA-CASTRO, P. Y.; MÉNDEZ-ROMERO, J. I.; HÉRNÁNDEZ-MENDOZA, A.; ACEDO-FÉLIX, F.; GONZÁLEZ-CÓRDOVA, A. F.; VALLEJO-CORDOBA, B. Antimicrobial activity and partial characterization of bacterio-like inhibitory substances produced by *Lactobacillus* spp. isolated from artisanal Mexican cheese. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 98, n. 12, p. 8285-8293, 2015. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0022030215007547>. Acesso em: 10 fev. 2020.

IBGE. INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **População no último censo**: cidade: Porteirinha, 2019. Disponível em: <https://cidades.ibge.gov.br/brasil/mg/porteirinha/panorama>. Acesso em: 2 abr. 2020.

IDF. INTERNATIONAL DAIRY FEDERATION. IDF 141. **Milk and liquid milk products**. Guidelines for the application of mid-infrared spectrometry, 2013a.

IDF. INTERNATIONAL DAIRY FEDERATION. IDF 161. **Milk. Bacterial count**. Protocol for the evaluation of alternative methods, 2013b.

IDF. INTERNATIONAL DAIRY FEDERATION. IDF 148-2. **Milk. Enumeration of somatic cells**. Part 2: Guidance on the operation of fluoro-opto-electronic counters, 2006.

IDF. INTERNATIONAL DAIRY FEDERATION. **Yogurt: enumeration of characteristic microorganisms colony count technique at 37°C**. IDF Standard 117A. Brussels: IDF, 1988.

IMA. INSTITUTO MINEIRO DE AGROPECUÁRIA. Portaria nº 2033, de 23 de Janeiro de 2021. Dispõe sobre os parâmetros e padrões físico-químicos e microbiológicos de alimentos de origem animal e água de abastecimento. 2021a. Disponível em: <http://www.ima.mg.gov.br/institucional/portarias#ano-2021>. Acesso em 5 fev. 2021.

IMA. INSTITUTO MINEIRO DE AGROPECUÁRIA. **Queijos artesanais**. 2021b. Disponível em: <http://www.ima.mg.gov.br/agroindustria/queijos-artesanais>. Acesso em: 3 jan. 2021.

IMA. INSTITUTO MINEIRO DE AGROPECUÁRIA. Portaria nº 1986, de 16 de junho de 2020. **Identifica o município de Alagoa como produtor do Queijo Artesanal de Alagoa**. 2020a. Disponível em: http://www.ima.mg.gov.br/index.php?preview=1&option=com_dropfiles&format=&task=frontfile.download&catid=1706&id=18014&Itemid=1000000000000. Acesso em: 2 abr. 2020.

IMA. INSTITUTO MINEIRO DE AGROPECUÁRIA. Portaria nº 1985, de 16 de junho de 2020. **Identifica a região da Mantiqueira como produtora do Queijo Artesanal Mantiqueira de Minas**. 2020b. Disponível em: http://www.ima.mg.gov.br/index.php?preview=1&option=com_dropfiles&format=&task=frontfile.download&catid=1706&id=18013&Itemid=1000000000000. Acesso em: 2 abr. 2020.

IMA. INSTITUTO MINEIRO DE AGROPECUÁRIA. Portaria nº 1825, de 19 de junho de 2018. **Identifica a região da Serra Geral do Norte de Minas como produtora de queijo artesanal**, 2018. Disponível em: http://www.ima.mg.gov.br/index.php?preview=1&option=com_dropfiles&format=&task=frontfile.download&catid=1349&id=14418&Itemid=1000000000000. Acesso em: 2 abr. 2020.

IMA. INSTITUTO MINEIRO DE AGROPECUÁRIA. Portaria nº 1427, de 29 de agosto de 2014. **Identifica a região do Vale do Suaçuí como produtora de parmesão no modo artesanal**, 2014. Disponível em: http://www.ima.mg.gov.br/index.php?preview=1&option=com_dropfiles&format=&task=frontfile.download&catid=1438&id=15264&Itemid=1000000000000. Acesso em: 2 abr. 2020.

INMET. INSTITUTO NACIONAL DE METEOROLOGIA. **Banco de dados meteorológicos para ensino e pesquisa**. 2019. Disponível em: www.inmet.gov.br/portal. Acesso em: 20 set. 2020.

INNOCENTE, N.; D'AGOSTIN, P. Formation of biogenic amines in a typical semi hard Italian cheese. **Journal of Food Protection**, Ames, v. 65, n. 9, p. 1498-1501, 2002. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12233866/>. Acesso em: 10 fev. 2020.

JANSEN, W.; LINARD, C.; NOLL, M.; NÖCKLER, K.; AL DAHOUK, S, Brucella-positive raw milk cheese sold on the inner European market: a public health threat due to illegal import? **Food Control**, v.100, p. 130-137, 2019. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0956713519300295>. Acesso em: 27 jan. 2020

JAY, J. M.; TONDO, E. C.; RECH, R. **Microbiologia de alimentos**. 6. ed. Porto Alegre: Artmed, 2005.

JOHLER, S.; GIANNINI, P.; JERMINI, M.; HUMMERJOHANN, J.; BAUMGARTNER, A.; STEPHAN, R. Further evidence for staphylococcal food poisoning outbreaks caused by egc-encoded enterotoxins. **Toxins (Basel)**, v. 7, n. 3, p. 997-1004, 2015. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4379538/>. Acesso em: 10 fev. 2020.

JONNALA, B. R. Y.; MCSWEENEY, P. L. H.; SHEEHAN, J. J.; COTTER, P. D. Sequencing of the cheese microbiome and its relevance to industry. **Frontiers in Microbiology**, v. 9, p. 1-12, 2018. Disponível em: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2018.01020/full>. Acesso em: 10 fev. 2020.

KAMIMURA, B. A.; MAGNANI, M.; LUCIANO, W. A.; CAMPAGNOLLO, F. B.; PIMENTEL, T. C.; ALVARENGA, V. O.; PELEGRINO, B. O.; CRUZ, A. G.; SANT'ANA, A. S. Brazilian artisanal cheeses: an overview of their characteristics, main types and regulatory aspects. **Comprehensive Reviews in Food Science Food Safety**, v. 18, p. 1636-1657, 2019. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/1541-4337.12486>. Acesso em: 10 fev. 2020.

KÖNIG, H.; FROHLICH, J.; UNDEN, G. (Eds.). Lactic Acid Bacteria. *In*: KONIG, H.; UNDEN, G.; FROHLICH, J. (Eds.). **Biology of Microorganisms on Grapes, in Must and in Wine**. Springer Nature, 2017. cap. 1, p. 3-41.

KOUTSOUMANIS, K.; TASSOU, C.; NYCHAS, G. J. Biogenic amines in foods. *In*: JUNEJA, V. K. S. J. (Ed.). **Pathogens and toxins in foods**. Washington: American Society of Microbiology, 2010. p. 248-274.

LADERO, V.; LINARES, D. M.; FERNANDEZ, M.; ALVAREZ, M. A. Real time quantitative PCR detection of histamine-producing lactic acid bacteria in cheese: relation with histamine content. **Food Research International**, Barking, v. 41, n. 10, p. 1015-1019, 2008. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0963996908001695>. Acesso em: 10 fev. 2020.

LEDINA, T.; GOLOB, M.; DJORDJEVIC, J.; MAGAS, V.; COLOVIC, S.; BULAJIC, S. MALDI-TOF mass spectrometry for the identification of Serbian artisanal cheeses microbiota. **Journal of Consumer Protection and Food Safety**, v. 13, n. 3, p. 309-314, 2018. Disponível em: <https://www.cabdirect.org/cabdirect/abstract/20183279370>. Acesso em: 10 fev. 2020.

LENIS, Y. Y.; ELMETWALLY, M. A.; MALDONADO-ESTRADA, J. G.; BAZER, F. W. Physiological importance of polyamines. **Zygoté**, Cambridge, v. 25, n. 3, p. 244-255, 2017. Disponível em: <https://www.cambridge.org/core/journals/zygote/article/abs/physiological-importance-of-polyamines/BAFC069480EADCEBD39B13DFD5CDD276>. Acesso em: 10 fev. 2020.

LEROY, F.; DE VUYST, L. Lactic acid bacteria as functional starter cultures for the food fermentation industry. **Trends in Food Science & Technology**, Cambridge, v. 15, p. 67-78, 2004. Disponível em:

<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0924224403002085>. Acesso em: 10 fev. 2020.

LICITRA, G.; CACCAMO, M.; LORTAL, S. **Artisanal Products Made With Raw Milk**. In *Raw Milk*, p. 175-221, 2019. Disponível em:

<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780128105306000092>. Acesso em: 09 mar. 2020.

LIMA, C. D. L. C.; LIMAL, A.; CERQUEIRA, M. M. O. P.; FERREIRA, E. G.; ROSA C. A. Bactérias do ácido láctico e leveduras associadas com o queijo Minas artesanal produzido na região da Serra do Salitre, Minas Gerais. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 61, n. 1, p. 266-272, 2009. Disponível em:

https://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0102-09352009000100037. Acesso em: 10 fev. 2020.

LINDNER, J. D.; BERNINI, V.; LORENTIIS, A.; PECORARI, A.; NEVIANI, E.; GATTI, M. Parmigiano Reggiano cheese: Evolution of cultivable and total lactic microflora and peptidase activities during manufacture and ripening. **Dairy Science and Technology**, Les Ulis, v. 88, n. 4-5, p. 511-523, 2008. Disponível em:

<https://link.springer.com/article/10.1051/dst:2008019>. Acesso em: 10 fev. 2020.

LIU, Y.; JIANG, Y.; ZHU, J.; HUANG, J.; ZHANG, H. Inhibition of bacterial adhesion and biofilm formation of sulfonated chitosan against *Pseudomonas aeruginosa*. **Carbohydrate Polymers**, Barking, v. 206, p. 412-419, 2018. Disponível em:

<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30553340/>. Acesso em: 10 fev. 2020.

LÖSER, C. Polyamines in human and animal milk. **British Journal of Nutrition**, Cambridge, v. 84, p. S55- S58, 2000. Disponível em:

<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11242447/>. Acesso em: 10 fev. 2020.

LUCIARDI, M. C.; BLÀZQUEZ, M. A.; CARTAGENA, E.; BARDON, A.; ARENA, M. E. Mandarin essential oils inhibit quorum sensing and virulence factors of *Pseudomonas aeruginosa*. **LWT Food Science Technology**, London, v. 68, n. 5, p. 373-380, 2016.

Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0023643815304138>. Acesso em: 10 fev. 2020.

LUIZ L. M. P.; CASTRO, R. D.; SANDES, S. H. C.; SILVA, J. G.; OLIVEIRA, L. G.; SALES, G. A.; NUNES, C.; SOUZA, M. R. Isolation and identification of lactic acid bacteria from Brazilian Minas artesanal cheese. **CYTA-Journal of Food**, v. 15, n. 1, p. 125-128, 2017. Disponível em:

https://www.researchgate.net/publication/311105216_Isolation_and_identification_of_lactic_acid_bacteria_from_Brazilian_Minis_artisanal_cheese. Acesso em: 10 fev. 2020.

MARGALHO, L. P.; SCHALKWIJK, S.; BACHMANN, H.; SANT'ANA, A. S. *Enterococcus* spp. in Brazilian artisanal cheeses: Occurrence and assessment of phenotypic and safety properties of a large set of strains through the use of high throughput tools combined with multivariate statistics. **Food Control**, Guildford, v. 118, p. 107425, 2020. Disponível em:

https://www.researchgate.net/publication/342332352_Antibiotic_Resistance_and_Biofilm_Pr

oduction_in_Catalase-Positive_Gram-Positive_Cocci_Isolated_from_Brazilian_Pasteurized_Milk. Acesso em: 10 fev. 2020.

MARINO, M.; MAIFRENI, M.; MORET, S.; RONDININI, G. The capacity of Enterobacteriaceae species to produce biogenic amines in cheese. **Letters in Applied Microbiology**, Oxford, v. 31, p. 169-173, 2000. Disponível em: <https://sfamjournals.onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1046/j.1365-2672.2000.00783.x>. Acesso em: 10 fev. 2020.

MARTÍ-DE OLIVES, A.; PERIS, C.; MOLINA, M. P. Effect of subclinical mastitis on the yield and cheese-making properties of ewe's milk. **Small Ruminant Research**, Amsterdam, v. 184, p. 1-28, 2019. Disponível em: <https://pubag.nal.usda.gov/catalog/6797014>. Acesso em: 10 fev. 2020.

MARTINS, J. M.; GALINARI, E.; PIMENTEL-FILHO, N. J.; RIBEIRO JÚNIOR, J. I.; FURTADO, M. M.; FERREIRA, C. L. L. F. Determining the minimum ripening time of artisanal Minas cheese, a traditional Brazilian cheese. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 46, n. 1, p. 219-230, 2015. Disponível em: https://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1517-83822015000100219. Acesso em: 10 fev. 2020.

MARTINS, M. C. F.; FREITAS, R.; DEUVAUX, J. C.; ELLER, M. R.; NERO, L. A.; CARVALHO, A. F. Bacterial diversity of artisanal cheese from the Amazonian region of Brazil during the dry and rainy seasons. **Food Research International**, Barking, v. 108, p. 295-300, 2018. Disponível em: <https://europemc.org/article/med/29735061>. Acesso em: 10 fev. 2020.

MATSUMOTO, M. Polyamines and longevity in mammals. *In*: KUSANO, T.; SUZUKI, H. (Eds.). **Polyamines**. Tokyo, Japan: Springer, 2015. p. 257-266.

MATSUMOTO, M.; KURIHARA, S. Probiotics-induced increase in creaseo flange intestinal luminal polyamine concentration may promote longevity. **Medical Hypotheses**, v. 77, n. 4, p. 469-472, 2011. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21745717/>. Acesso em: 10 fev. 2020.

MAYER, H. K.; FIECHTER, G.; FISCHER, E. A new ultra-pressure liquid chromatography method for the determination biogenic amines in cheese. **Journal of Chromatography A.**, Amsterdam, v. 1217, n. 19, p. 3251-3257, 2010. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19781707/>. Acesso em: 10 fev. 2020.

MAZLOUM-ARDAKANI, M.; BEITOLLAHI, H.; MOHSENI, M. A.; BENVIDI, A.; NAEIMI, H.; NEJATI-BARZOKI, M.; TAGHAVINIA, N. Simultaneous determination of epinephrine and acetaminophen concentrations using a novel carbon paste electrode prepared with 2, 2-[1,2 butanediylbis (nitriloethylidene)]-bis-hydroquinone and TiO₂ nano particles. **Colloids and Surfaces B, Biointerfaces**, Amsterdam, v. 76, n. 1, p. 82-87, 2010. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19913392/>. Acesso em: 10 fev. 2020.

MCAULIFFE, O.; KILCAWLEY, K.; STEFANOVIC, E. Symposium review: Genomic investigations of flavor formation by dairy microbiota. **Journal of Dairy Science**,

Champaign, v. 102, n. 1, p. 909-922, 2019. Disponível em:

<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0022030218309895>. Acesso em: 15 fev. 2020.

MCDERMOTT, A.; VISENTIN, G.; MCPARLAND, S.; BERRY, D. P.; FENELON, M. A.; DE MARCHI, M. Effectiveness of mid-infrared spectroscopy to predict the color of bovine milk and the relationship between milk color and traditional milk quality traits. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 99, n. 5, p. 3267-3273, 2016. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26898278/>. Acesso em: 10 fev. 2020.

MCSWEENEY, P. L. H. Biochemistry of cheese ripening. **International Journal of Dairy Technology**, Huntingdon, v. 57, n. 2-3, p. 127-144, 2004. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/j.1471-0307.2004.00147.x>. Acesso em: 10 fev. 2020.

MEHLOMAKULU, N. N. **Yeasts as adjunct starter cultures in cheese making**. 2011. Masters (Magister Scientiae)-Faculty of Natural and Agricultural Sciences, University of the Free State, Bloemfontein, 2011.

MELO, P. C.; FERREIRA, L. M.; NADER, F. A.; ZAFALON, L. F.; VICENTE, H. I. G. Análise fenotípica e molecular da produção de biofilme por estirpes de *Staphylococcus aureus* isoladas de casos de mastite subclínica bovina. **Bioscience Journal**, Uberlândia, v. 28, n. 1, p. 94-99, 2012. Disponível em: <http://www.seer.ufu.br/index.php/biosciencejournal/article/view/12533>. Acesso em: 10 fev. 2020.

MENEZES, I. R.; ALMEIDA, A. C.; PINTO, M. S.; VELASCO, F. O.; MAIA, F. P.; RODRIGUES, J. V. Caracterização de unidades agrícolas familiares produtoras de leite no Norte do estado de Minas Gerais. **Revista Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, Juiz de Fora, v. 69, n. 3, p. 153-163, 2014. Disponível em: <https://www.revistadoilct.com.br/riilct/article/view/342>. Acesso em: 10 fev. 2020.

MENEZES, S.S.M.; CRUZ, F.T.; MENASCHE, R. Queijo de Coalho e Queijo Artesanal Serrano: identidades de produtores e de consumidores associadas a atributos de qualidade. In: CONGRESSO LATIO-NAMERICANO DE SOCIOLOGÍA RURAL, 8, Porto de Galinhas, 2010.

METZ, M.; SHEEHAN, J.; FENG, P. C. H. Use of indicator bacteria for monitoring sanitary quality of raw Milk cheeses-A literature review. **Food Microbiology**, London, v. 85, p. 1-11, 2020. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0740002018311213>. Acesso em: 10 fev. 2020.

MILEWSKI, S.; ZĄBEK, K.; ANTOSZKIEWICZ, Z.; TAŃSKI, Z.; SOBCZAK, A. Impact of Production Season on the Chemical Composition and Health Properties of Goat Milk and Rennet Cheese. **Emirates Journal of Food and Agriculture**, v. 30, n. 2, p. 107-14, 2018. Disponível em: <https://www.ejfa.me/index.php/journal/article/view/1602>. Acesso em: 10 fev. 2020.

MINAS GERAIS. Assembleia Legislativa do Estado de Minas Gerais. **Decreto nº 48.024, de 19 de agosto de 2020**. Regulamenta a Lei nº 23.157, de 18 de dezembro de 2018, que dispõe sobre a produção e a comercialização dos queijos artesanais de Minas Gerais. Belo Horizonte: Assembleia Legislativa do Estado de Minas Gerais, 2020. Disponível em: https://www.almg.gov.br/consulte/legislacao/completa/completa.html?tipo=DEC&num=48024&comp=&ano=2020&aba=js_textoOriginal#texto. Acesso em: 20 ago. 2020.

MINAS GERAIS. Assembleia Legislativa do Estado de Minas Gerais. **Decreto nº 42.645, de 5 de junho de 2002**. Aprova o Regulamento da Lei nº 14.185, de 31 de janeiro de 2002, que dispõe sobre o processo de produção de Queijo Minas Artesanal. Belo Horizonte: Assembleia Legislativa do Estado de Minas Gerais. Disponível em: https://www.almg.gov.br/consulte/legislacao/completa/completa.html?tipo=DEC&num=42645&comp=&ano=2002&aba=js_textoAtualizado. Acesso em: 2 jun. 2020.

MINAS GERAIS. Assembleia Legislativa do Estado de Minas Gerais. **Lei nº 14.185, de 31 de janeiro de 2002**. Dispõe sobre o processo de produção de Queijo Minas Artesanal e dá outras providências. Belo Horizonte: Assembleia Legislativa do Estado de Minas Gerais, 2002. Disponível em: <https://www.almg.gov.br/consulte/legislacao/completa/completa.html?tipo=LEI&num=14185&comp=&ano=2002>. Acesso em: 2 jul. 2018.

MINAS GERAIS. Assembleia Legislativa do Estado de Minas Gerais. **Lei nº 23.157, de 18 de dezembro de 2018**. Dispõe sobre a produção e a comercialização dos queijos artesanais de Minas Gerais. Belo Horizonte: Assembleia Legislativa do Estado de Minas Gerais. Disponível em: <https://www.almg.gov.br/consulte/legislacao/completa/completa.html?tipo=LEI&num=23157&comp=&ano=2018>. Acesso em: 3 jan. 2019.

MØLLER, A. C. O.; ÜCOK, E. F.; RATTRAY, F. P. Histamine forming behaviour of bacterial isolates from aged cheese. **Food Research International**, Barking, v. 128, p. 108719, 2020. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31955783/>. Acesso em: 10 fev. 2020.

MONTANHA, A. A. O. **Aminas biogênicas e polifenóis no leite e queijo de Ovelhas da raça Bergamácia suplementadas com óleo ou farelo de linhaça (*Linum usitassimum* L.)**. 2016. Tese (Doutorado em Zootecnia)-Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2016. Disponível em: <https://repositorio.unesp.br/handle/11449/137766>. Acesso em: 10 fev. 2020.

MONTEIRO, R. P.; MATTA, V. M. **Queijo Minas Artesanal: valorizando a agroindústria familiar**. Rio de Janeiro: Embrapa Agroindústria de Alimentos, 2018.

MOREIRA, G. M. M.; COSTA, R. G. B.; TEODORO, V. A. M.; PAULA, J. C. J.; SOBRAL, D.; FERNANDES, C.; GLORIA, M. B. A. Effect of ripening time on proteolysis, free amino acids, bioactive amines and texture profile of Gorgonzola-type cheese. **LWT Food Science and Technology**, London, v. 98, p. 583-590, 2018. Disponível em: https://www.researchgate.net/publication/327616950_Effect_of_ripening_time_on_proteolysis_free_amino_acids_bioactive_amines_and_texture_profile_of_Gorgonzola-type_cheese. Acesso em: 10 fev. 2020.

MOREIRA, G. M. M.; SOBRAL, D.; COSTA, R. G. B.; PAULA, J. C. J.; FERNANDES, C.; GLÓRIA, M. B. A. Parâmetros de desempenho em método UHPLC-UV para quantificação de aminoácidos livres e amins bioativas em queijos Mussarela, Prato, Parmesão e Gorgonzola. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, Juiz de Fora, v. 72, n. 4, p. 192-204, 2017. Disponível em: <https://www.revistadoilct.com.br/rilct/article/view/635>. Acesso em: 10 fev. 2020.

MORGAN, S. M.; SULLIVAN, L. A.; ROSS, R. P.; HILL, C. The design of a three strain starter system for Cheddar cheese manufacture exploiting bacteriocin-induced starter lysis. **International Journal of Dairy Technology**, Huntingdon, v. 12, n. 12, p. 985-993, 2002. Disponível em: https://www.researchgate.net/publication/223853842_The_design_of_a_three_strain_system_for_Ceddar_cheese_manufacture_exploiting_bacteriocin-induced_starter_lysis. Acesso em: 10 fev. 2020.

MUÑOZ-ESPARZA, N. C.; LATORRE-MORATALLA, M. L.; COMAS-BASTÉ, O.; TORO-FUNES, N.; VECIANA-NOGUÉS, M. T.; VIDAL-CAROU, M. C. Polyamines in Food. **Frontiers in Nutrition**, v. 6, n. 108, 2019. Disponível em: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fnut.2019.00108/full>. Acesso em: 10 fev. 2020.

MUSTAFA, F.; ANDREESCU, S. Chemical and biological sensors for food-quality monitoring and smart packaging. **Foods**, v. 7, n. 10, p. 168, 2018. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6210272/>. Acesso em: 10 fev. 2020.

NERES, L. L. F. G.; NERES, N. J. C. I.; CARVALHO, A. V.; CERQUEIRA, F. B.; SANTANA, D. L.; PEREIRA, T. A.; KOZUSNY-ANDREANI, D. I. Perfil de sensibilidade microbiana in vitro de cepas de Escherichia coli e Klebsiella pneumoniae isoladas de queijo artesanal. **Revista Ibero-Americana de Ciências Ambientais**, Aracaju, v. 10, n. 3, p. 20-29, 2019. Disponível em: https://www.researchgate.net/publication/336572751_Perfil_de_sensibilidade_microbiana_in_vitro_de_cepas_de_Escherichia_coli_e_Klebsiella_pneumoniae_isoladas_de_queijo_artesanal. Acesso em: 10 fev. 2020.

NGO, D. H.; VO, T. S. An updated review on pharmaceutical properties of gamma-aminobutyric acid. **Molecules**, v. 24, n. 15, p. 2678, 2019. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31344785/>. Acesso em: 10 fev. 2020.

NOBREGA, J. E.; FERREIRA, C.; DORES, M.; FERREIRA, E.; DOMINGO, E. C.; SANTOS, J. P. V. Variações na microbiota leveduriforme do fermento endógeno utilizado na produção do queijo Canastra. **Revista do Instituto de Laticínio Cândido Tostes**, Juiz de Fora, v. 63, n. 364, p. 14-18, 2008. Disponível em: <https://www.revistadoilct.com.br/rilct/article/view/59>. Acesso em: 10 fev. 2020.

OLIVES, A. M., PERIS, C.; MOLINA, M. P. Effect of subclinical mastitis on the yield and cheese-making properties of ewe's milk. **Small Ruminant Research**, v.19, 106044. 2020. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0921448819302615>. Acesso em: 2 dez. 2020.

OLIVEIRA, A. L.; CRUZ, R. G.; PASSOS, L. P.; ALVES, L. C.; DORES, M. T. Caracterização do queijo Minas artesanal do Cerrado Mineiro da região do Alto Paranaíba. **The Journal of Engineering and Exact Sciences**, v. 3, n. 6, p. 824-828, 2017. Disponível em: <https://periodicos.ufv.br/jcec/article/view/2391>. Acesso em: 10 fev. 2020.

OLIVEIRA, L. G. **Caracterização microbiológica e físico-química durante a maturação em diferentes épocas do ano de Queijo Minas Artesanal de produtores cadastrados da mesorregião de Campo das Vertentes-MG**. 2014. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal)-Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2014. Disponível em: <https://repositorio.ufmg.br/handle/1843/SMOC-9NYJD6>. Acesso em: 10 fev. 2020.

OLIVEIRA, S. P.; MARTINS, J. M.; NOGUEIRA, C. H.; VALE, R. C.; RODRIGUES, M. P. J.; GALLETI, A. N. Características físico-químicas de queijo Minas artesanal do Serro fabricados com pingo e com rala. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, Juiz de Fora, v. 73, n. 4, p. 235-244, 2018. Disponível em: <https://www.revistadoilct.com.br/rilct/article/view/717>. Acesso em: 10 fev. 2020.

ONER, Z.; KARAHAN, A. G.; ALOGLU, H. S. Changes in the microbiological and chemical characteristics of an artisanal Turkish White cheese during ripening. **LWT Food Science and Technology**, London, v. 39, n. 5, p. 449-454, 2006. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5932974/>. Acesso em: 10 fev. 2020.

OUADGHIRI, M.; AMAR, M.; VANCANNEYT, M.; SWINGS, J. Biodiversity of lactic acid bacteria in Moroccan soft white cheese (Jben). **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 251, n. 2, p. 267-271, 2005. Disponível em: <https://academic.oup.com/femsle/article/251/2/267/601994>. Acesso em: 10 fev. 2020.

ÖZOGUL, F.; HAMED, I. The importance of lactic acid bacteria for the prevention of bacterial growth and their biogenic amines formation: A review. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, Boca Raton, v. 58, n. 10, p. 1660-1670, 2018. Disponível em: https://www.researchgate.net/publication/313022314_The_importance_of_lactic_acid_bacteria_for_the_prevention_of_bacterial_growth_and_their_biogenic_amines_formation_A_review. Acesso em: 10 fev. 2020.

PAGTHINATHAN, M.; NAFEES, M. S. M. Biochemistry of cheese ripening. **AGRIEAST: Journal of Agricultural Sciences**, v. 10, p. 16-26, 2015. Disponível em: https://www.researchgate.net/publication/313258453_Biochemistry_of_cheese_ripening. Acesso em: 10 fev. 2020.

PARK, Y. W. Goat Milk-Chemistry and Nutrition. *In*: PARK, Y. W.; HAENLEIN, G. F. W.; WENDORFF, W. L. (Eds.). **Handbook of Milk of Non-Bovine Mammals**. Oxford: Black Well Publishing, 2017. p. 42-83.

PEREIRA, D. A.; PAIVA, P. H.C.; PAIVA, E. C. F.; CAMPOS, I. T.; CARVALHO, A. M. O.; FOGAÇA, G. N. Caracterização dos sistemas de abastecimento de água de queijarias da microrregião Campo das Vertentes. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, Juiz de Fora, v. 69, n. 4, p. 258-267, 2014. Disponível em: <https://www.revistadoilct.com.br/rilct/article/view/314>. Acesso em: 10 fev. 2020.

- PEREIRA, D. B. C.; SILVA, P. H. F.; COSTA JÚNIOR, L. C. G.; OLIVEIRA, L. L. **Físico-química do leite e derivados: métodos analíticos**. 2. ed. Juiz de Fora: Templo Gráfica e Editora, 2001.
- PEREIRA, M. D.; ASSIS, T. R. P. Pesquisa-ação para o reconhecimento da região “Serras da Ibitipoca” como produtora de queijo minas artesanal. **Revista Conexão UEPG**, Ponta Grossa, v. 15, n. 2, p. 147-155, 2019. Disponível em: <http://repositorio.ufla.br/handle/1/39746>. Acesso em: 10 fev. 2020.
- PEREIRA, N. M.; SILVA, J. R.; FREIRE, I. S. F.; ESCATOLIN, L. C.; TALLAMINI, S. C. Microbiota do Queijo Artesanal Serrano produzido em Santa Catarina, Brazil. **Revista de Ciências Agroveterinárias**, Lages, v. 18, n. 4, p. 536-542, 2019. Disponível em: <https://www.revistas.udesc.br/index.php/agroveterinaria/article/view/12658>. Acesso em: 10 fev. 2020.
- PERIN, L. M.; BELVISO, S.; BELLO, B.; NERO, L. A.; COCOLIN, L. Technological Properties and Biogenic Amines Production by Bacteriocinogenic Lactococci and Enterococci Strains Isolated from Raw Goat’s Milk. **Journal of Food Protection**, Ames, v. 80, n. 1, p. 151-157, 2017b. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28221886/>. Acesso em: 10 fev. 2020.
- PERIN, L. M.; SARDARO, M. L. S.; NERO, L. A.; NEVIANI, E.; GATTI, M. Bacterial ecology of artisanal Minas cheeses assessed by culture-dependent and -independent methods. **Food Microbiology**, London, v. 65, p. 160-169, 2017a. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28399998/>. Acesso em: 10 fev. 2020.
- PERRY, K. S. P. Queijos: aspectos químicos, bioquímicos e microbiológicos. **Química Nova**, São Paulo, v. 27, n. 2, p. 293-300, 2004. Disponível em: https://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0100-40422004000200020&script=sci_abstract&tlng=es. Acesso em: 10 fev. 2020.
- PHILLIPS, P. L.; WOLCOTT, R. D.; FLETCHER, J.; SCHULTZ, G. S. Biofilms made easy. **Wounds International**, v. 1, n. 3, p. 1-6, 2010. Disponível em: <https://www.woundsinternational.com/uploads/resources/6e7ffcddef76d9d3e652be2854315a6.pdf>. Acesso em: 10 fev. 2020.
- PINTO, M. S. **Efeito da microbiota endógena e da nisina sobre *Listeria sp.* e *Staphylococcus aureus* em queijo Minas artesanal do Serro**. 2008. Tese (Doutorado em Ciência e Tecnologia de Alimentos)-Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2008. Disponível em: <https://www.locus.ufv.br/handle/123456789/404>. Acesso em: 20 fev. 2020.
- PINTO, M. S.; CARVALHO, A. F.; PIRES, A. C. S.; SOUZA, A. A. C.; SILVA, P. H. F.; SOBRA, D.; PAULA, J. C. J.; SANTOS, A. L. The effects of nisin on *Staphylococcus aureus* count and the physico chemical properties of Traditional Minas Serro cheese. **International Dairy Journal**, Barking, v. 21, n. 2, p. 90-96, 2011. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25981063/>. Acesso em: 10 fev. 2020.
- PINTO, M. S.; LEMPK, M. W.; CABRINI, C. C.; SARAIVA, L. K. V.; CANGUSSU, R. R. C.; CUNHA, A. L. F. S. Características físico-químicas e microbiológicas de queijo artesanal

produzido na microrregião de Montes Claros-MG. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, Juiz de Fora, v. 71, n. 1, p. 43-52, 2016. Disponível em: <https://www.revistadoilct.com.br/rilct/article/view/514>. Acesso em: 10 fev. 2020.

POPPI, L. B. **Avaliação do efeito antagônico de espécies de *Lactobacillus* sobre *Escherichia coli* O157:H7 e *Listeria monocytogenes***. 2005. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia Industrial)-Universidade de São Paulo, Lorena, 2005. Disponível em: <http://sistemas.eel.usp.br/bibliotecas/antigas/2005/BID05001.pdf>. Acesso em: 10 fev. 2020.

POVEDA, J. M.; CHICÓN, R.; CABEZAS, L. Biogenic amine content and proteolysis in Manchego cheese manufactured with *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* as adjunct and other autochthonous strains as starters. **International Dairy Journal**, Barking, v. 47, p. 94-101, 2015. Disponível em: <https://europepmc.org/article/agr/ind605336840>. Acesso em: 10 fev. 2020.

PRADHAN, T.; JUNG, H. S.; JANG, J. H.; KIM, T. W.; KANG, C.; KIM, J. S. Chemical sensing of neurotransmitters. **Chemical Society Reviews**, London, v. 43, n. 13, p. 4684-4713, 2014. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24736802/>. Acesso em: 10 fev. 2020.

PRATA, B. M.; SILVA, A. C.; VIANNA, P. C. B.; NAVES, E. A. A. Sensory and physicochemical profile of artisanal Minas cheese produced in the micro-region of Araxá, Brazil. **Research, Society and Development**, v. 9, n. 9, p. e671997782, 2020. Disponível em: <https://rsdjournal.org/index.php/rsd/article/view/7782>. Acesso em: 10 fev. 2020.

PURTY, S.; SARANATHAN, R.; PRASHANTH, K.; NARAYANAN, K.; ASIR, J.; DEVI, C. S.; AMARNATH, S. K. The expanding spectrum of human infections caused by *Kocuria* species: a case report and literature review. **Emerging Microbes and Infections**, v. 2, n. 10, p. 1-8, 2013. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3826069/>. Acesso em: 10 fev. 2020.

RAFAEL, V. C. **Fenótipos da microbiota predominante do fermento endógeno (pingo) relevantes para as características e segurança microbiológica do queijo Minas artesanal da Serra da Canastra**. 2017. Tese (Doutorado em Ciência e Tecnologia de Alimentos)-Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2017. Disponível em: <https://www.locus.ufv.br/handle/123456789/17195>. Acesso em: 20 mar. 2020.

RENES, E.; LADERO, V.; TORNADIJO, M. E.; FRESNO, J. M. Production of sheep milk cheese with high γ -aminobutyric acid and ornithine concentration and with reduced biogenic amines level using autochthonous lactic acid bacteria strains. **Food Microbiology**, London, v. 78, p. 1-10, 2019. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0740002018303496>. Acesso em: 10 fev. 2020.

RENYE, G. A.; SOMKUTI, D. L.; VAN HEKKEN, V. M. GUERRERO-PRIETO Short communication: Characterization of microflora in Mexican Chihuahua cheese. **Journal of Dairy Science**, v.94, p. 3311-3315, 2011. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0022030211003249>. Acesso em: 10 fev. 2020.

RESENDE, M. F. S.; COSTA, H. H. S.; ANDRADE, E. H. P.; ACÚRCIO, L. B.; DRUMMOND, A. F.; CUNHA, A. F.; NUNES, A. C.; MOREIRA, J. L. S.; PENNA, C. F. A. M.; SOUZA, M. R. Queijo de minas artesanal da Serra da Canastra: influência da altitude das queijarias nas populações de bactérias ácido-lácticas. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 63, n. 6, p. 1567-1573, 2011. Disponível em: https://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0102-09352011000600039&script=sci_abstract&tlng=pt. Acesso em: 10 fev. 2020.

RIGUEIRA, J. C. S.; RODRIGUES, M. I.; GLORIA, M. B. A. Optimization of the analytical extraction of polyamines from milk. **Talanta**, London, v. 86, p. 195-199, 2011. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22063530/>. Acesso em: 10 fev. 2020.

RODRÍGUEZ, M. M. L.; TORNADIJO, M. E.; CABALLO, J.; SARMIENTO, R. M. Microbiological study of León raw cow-milk cheese, a Spanish craft variety. **Journal of Food Protection**, v. 58, n. 9, p. 998-1006, 1995. Disponível em: <https://meridian.allenpress.com/jfp/article/58/9/998/168825/Microbiological-Study-of-Leon-Raw-Cow-Milk-Cheese>. Acesso em: 19 de dez. 2020.

ROLDAN, B. B.; REVILLION, J. P. P. Convenções de qualidade em queijos artesanais no Brasil, Espanha e Itália. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, Juiz de Fora, v. 74, n. 2, p. 108-122, 2019. Disponível em: <https://www.revistadoilct.com.br/rilct/article/view/730>. Acesso em: 10 fev. 2020.

RUIZ-CAPILLAS, C.; HERRERO, A. M. Impact of biogenic amines on food quality and safety. **Foods**, v. 8, n. 2, p. 1-16, 2019. Disponível em: <https://www.mdpi.com/2304-8158/8/2/62>. Acesso em: 10 fev. 2020.

SAKR, A.; BRÉGEON, F.; MÈGE, J. L.; ROLAIN, J. M.; BLIN, O. *Staphylococcus aureus* Nasal Colonization: An Update on Mechanisms, Epidemiology, Risk Factors, and Subsequent Infections. **Frontiers Microbiology**, v. 9, p. 2419, 2018. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6186810/>. Acesso em: 10 fev. 2020.

SALES, G. A. **Caracterização microbiológica e físico-química de queijo Minas artesanal da microrregião de Araxá-MG durante a maturação em diferentes épocas do ano**. 2015. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal)-Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2015. Disponível em: <https://repositorio.ufmg.br/handle/1843/SMOC-A4MHTZ>. Acesso em: 10 fev. 2020.

SANLI, T.; SENEL, E. Formation of Biogenic Amines in Cheese. *In*: SANLI, T.; SENEL, E. **Processing and Impact on Active Components in Food**. cap. 27. p. 223-230, 2015. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780124046993000275?via%3Dihub>. Acesso em: 17 ago. 2020.

SANTANA, E. H. W.; BELOTI, V.; ARAGON-ALEGRO, L. C.; MENDONÇA, M. B. O. C. **Arquivo do Instituto de Biologia**, São Paulo, v. 77, n. 3, p. 545-554, 2010. Disponível em: Acesso em: 10 fev. 2020.

SANT'ANNA, F. M.; WETZELSB, S. U.; CICCIO, S. H. S.; FIGUEIREDO, R. C.; SALES, G. A.; FIGUEIREDO, N. C.; NUNES, C. A. SCHMITZ-ESSER, S.; MANN, E.; WAGNER, M.; SOUZA, M. R. Microbial shifts in Minas artisanal cheeses from the Serra do Salitre region of Minas Gerais, Brazil throughout ripening time. **Food Microbiology**, London, v. 82, p. 349-362, 2019. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31027793/>. Acesso em: 10 fev. 2020.

SANTIAGO-LÓPEZ, L.; AGUILAR-TOALÁ, J. E.; HERNÁNDEZ-MENDOZA, A., VALLEJO-CORDOBA, B.; LICEAGA, A. M.; GONZÁLEZ-CÓRDOVA, A. F. Invited review: Bioactive compounds produced during cheese ripening and health effects associated with aged cheese consumption. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 101, n. 5, p. 3742-3757, 2018. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0022030218301462>. Acesso em: 10 fev. 2020.

SANTIAGO-SILVA, P.; LABANCA, R. A.; GLÓRIA, M. B. A. Functional potential of tropical fruits with respect to free bioactive amines. **Food Research International**, Barking, v. 44, n. 5, p. 1264-1268, 2011. Disponível em: <https://europepmc.org/article/agr/ind44592268>. Acesso em: 10 fev. 2020.

SANTOS FILHO, A. S.; PIRES, C. V.; PEREIRA, A. A.; CARDOSO, W. J.; PINTO, M. P.; OLIVEIRA, N. J. F. Caracterização física e condições sanitárias do comércio de queijo cabacinha em três municípios do Vale do Jequitinhonha, MG, Brasil. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, Juiz de Fora, v. 71, n. 4, p. 219-227, 2016. Disponível em: <https://www.revistadoilct.com.br/riilct/article/view/511>. Acesso em: 10 fev. 2020.

SANTOS FILHO, A. S.; PIRES, C. V.; SILVA, A. M.; SILVA, L. S.; PINTO, M. S.; LEAL, G. T.; OLIVEIRA, N. J. F. Microbiological and chemical characterization of Cabacinha cheese marketed in three municipalities in Vale do Jequitinhonha. **Research, Society and Development**, v. 9, n. 9, p. e979998049, 2020. Disponível em: <https://rsdjournal.org/index.php/rsd/article/view/8049>. Acesso em: 20 fev. 2020.

SANTOS, J. S.; CARDOSO, J. H., DA CRUZ, F. T., DOS ANJOS, F. S. Dilemas e desafios para circulação de queijos artesanais no Brasil. **Vigilância Sanitária em Debate: Sociedade, Ciência & Tecnologia**, v. 4, n. 4, p. 13-22, 2016. Disponível em: <https://visaemdebate.incqs.fiocruz.br/index.php/visaemdebate/article/view/617>. Acesso em jan.2021.

SANTOS, E. B.; CONTE JÚNIOR, C. A.; MÁRSICO, E. T.; FRANCO, R. M.; GOMES, V. S.; ROSA, B. B.; MANTILLA, S. P.; CALIXTO, F. A. A.; SILVA, A. C. O. Potential biogenic amine-producing bacteria in ripened cheeses. **Revista Brasileira de Ciência Veterinária**, Niterói, v. 24, n. 4, p. 207-215, 2017. Disponível em: <https://periodicos.uff.br/rbcv/article/view/7754>. Acesso em: 25 fev. 2020.

SARAIVA, L. K. V. **Caracterização do sistema de produção do queijo artesanal da Serra Geral-MG**. 2018. Dissertação (Mestrado em Produção Animal)-Universidade Federal de Minas Gerais, Montes Claros, 2018. Disponível em: <https://repositorio.ufmg.br/handle/1843/NCAP-B63HXE>. Acesso em: 25 fev. 2020.

SCALLAN, E.; HOEKSTRA, R. M.; ANGULO F, J.; TAUXE, R. V.; WIDDOWSON, M. A.; ROY, S. L.; JONES, J. L.; GRIFFIN, P. M. Foodborne illness acquired in the United States-major pathogens. **Emerging Infectious Diseases**, Atlanta, v. 17, n. 1, p. 7-15, 2011. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21192848/>. Acesso em: 10 fev. 2020.

SCHIRONE, M.; TOFALO, R.; FASOLI, G.; PERPETUINI, G.; CORSETTI, A.; MANETTA, A. C.; CIARROCCHI, A.; SUZZI, G. High content of biogenic amines in Pecorino cheeses. **Food Microbiology**, London, v. 34, n. 1, p. 137-144, 2013. Disponível em: https://www.researchgate.net/publication/236052614_High_content_of_biogenic_amines_in_Pecorino_cheeses. Acesso em: 20 mar. 2020.

SHALABY, A. R. Significance of biogenic amines to food safety and human health. **Food Research International**, Barking, v. 29, n. 7, p. 675-690, 1996. Disponível em: Acesso em: 10 fev. 2020.

SHARMA, V. K.; BEARSON, B. L. Hha controls *Escherichia coli* O157:H7 bio film formation in by differential regulation of the global transcriptional regulators FlhDC and CsgD. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 79, n. 7, p. 2384-2396, 2013. Disponível em: <https://aem.asm.org/content/79/7/2384>. Acesso em: 10 fev. 2020.

SILLA-SANTOS, M. H. Biogenic amines: their importance in foods. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 29, n. 2-3, p. 213-231, 1996. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8796424/>. Acesso em: 10 fev. 2020.

SILVA, J. G. **Identificação molecular de bactérias ácido lácticas e propriedades probióticas in vitro de *Lactobacillus* spp. isolados de queijo Minas artesanal de Araxá, Minas Gerais**. 2016. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal)-Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2016. Disponível em: <https://repositorio.ufmg.br/handle/1843/SMOC-A77FYH>. Acesso em: 10 fev. 2020.

SILVA, J. G.; ABREU, L. R.; FERREIRA, E. B.; MAGALHÃES, F. A. R.; PICCOLI, R. H. Características físico-químicas do queijo Minas artesanal da Canastra. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, Juiz de Fora, v. 66, n. 380, p. 16-22, 2011. Disponível em: <https://www.revistadoilct.com.br/rilct/issue/view/24>. Acesso em: 10 fev. 2020.

SILVA, J. P. L.; RIBEIRO, A. P. O.; COSTA, S. D. O.; MELLO, V. F. LINDENBLATT, C. T. ***Staphylococcus spp.*: incidência e surtos**. Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológica, 2015.

SILVA, R. A.; BISMARA, P. A.; MOURA, R. B.; LIMA FILHO, J. L.; PORTO, A. L. F.; CAVALCANTI, M. T. H. Avaliação da microbiota bacteriana do queijo de coalho artesanal produzido na região Agreste do estado de Pernambuco. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 64, n. 6, p. 1732-1738, 2012. Disponível em: https://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0102-09352012000600044&script=sci_abstract&tlng=pt. Acesso em: 10 fev. 2020.

SMIT, G.; SMIT, B. A.; ENGELS, W. J. M. Flavour formation by lactic acid bacteria and biochemical flavour profiling of cheese products. **FEMS Microbiology Reviews**, Amsterdam, v. 29, p. 591-610, 2005. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15935512/>. Acesso em: 10 fev. 2020.

SOARES, D. B.; MONTEIRO, G. P.; FONSECA, B. B.; FREITAS, E. A.; MENDONÇA, E. P.; MELO, R. T.; IASBECK, J. R.; ROSSI, D. A. Análise sanitária e físico-química e adequação bacteriológica do queijo Minas artesanal produzido em duas propriedades. **Ciência Animal Brasileira**, Goiânia, v. 19, p. 1-13, 2018. Disponível em:

https://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1809-68912018000100320. Acesso em: 10 fev. 2020.

SOBRAL, D.; COSTA, R. G. B.; PAULA, J. C. J.; TEODORO, V. A. M.; MOREIRA, G. M.; PINTO, M. S. Principais defeitos de queijos Minas artesanais fabricados na região da Canastra. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, Juiz de Fora, v. 72, n. 3, p. 174-183, 2017. Disponível em: <https://www.revistadoilct.com.br/rilct/issue/view/62>. Acesso em: 10 fev. 2020.

SOUZA, B. R.; PIRES, C. V.; UBALDO, J. C. R.; REIS, G. B.; TROMBETE, F. M. Estudo de viabilidade econômica e financeira para produção artesanal de queijo cabacinha na região do Vale do Jequitinhonha-MG. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, Juiz de Fora, v. 75, n. 1, p. 45-58, 2020. Disponível em:

<https://www.revistadoilct.com.br/rilct/issue/view/72>. Acesso em: 10 fev. 2020.

SOUZA, C. F. V.; DALLA ROSA, T.; AYUB, M. A. Z. Changes in the microbiological and physicochemical characteristics of Serrano cheese during manufacture and ripening.

Brazilian of Journal Microbiology, v. 34, n. 3, p. 260-266, 2003. Disponível em:

https://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1517-83822003000300016. Acesso em: 20 mar. 2020.

SOUZA, M. R. Queijo Minas Artesanal. **Cadernos Técnicos de Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, n. 95, p. 1-55, 2019. Disponível em:

https://vet.ufmg.br/editora/cadernos_tecnicos/encontro-nacional-de-patologia-veterinaria-enapave-cd-rom/. Acesso em: 10 fev. 2020.

SPADOTI, L. M.; DORNELLAS, J. F. R.; PETENATE, A. J.; ROIG, S. M. Avaliação do rendimento do queijo tipo prato obtido por modificações no processo tradicional de fabricação. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 23, n. 3, p. 492-499, 2003.

Disponível em: [https://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0101-](https://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0101-20612003000300033&script=sci_abstract&tlng=pt)

[20612003000300033&script=sci_abstract&tlng=pt](https://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0101-20612003000300033&script=sci_abstract&tlng=pt). Acesso em: 20 mar. 2020.

TALLENT, S.; HAIT, J.; BENNETT, R. W.; LANCETTE, G. A. *Staphylococcus aureus*. In: U.S. Food and Drug Administration. **Bacteriological Analytical Manual (BAM) Main Page**. 2019. Disponível em: [https://www.fda.gov/food/laboratory-methods-food/bam-chapter-](https://www.fda.gov/food/laboratory-methods-food/bam-chapter-12-staphylococcus-aureus)

[12-staphylococcus-aureus](https://www.fda.gov/food/laboratory-methods-food/bam-chapter-12-staphylococcus-aureus). Acesso em: 2 dez. 2020.

TAVARES, H. F. M.; VANNUCCHI, H. Aminoácidos: funções e segurança. In: TAVARES, H. F. M.; VANNUCCHI, H. **Força-Tarefa de Alimentos Fortificados e Suplementos**. São Paulo, 2016. cap. 1. p. 13-36.

TAVARIA, F. K.; FRANCO, I.; CARBALLO, F. J.; MALCATA F. X. Amino acid and soluble nitrogen evolution through outripening of Serra da Estrela cheese. **International Dairy Journal**, Barking, v. 13, n. 7, p. 537-545, 2003. Disponível em:

<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0958694603000608>. Acesso em: 10 fev. 2020.

TEBALDI, V. M. R.; OLIVEIRA, T. L. C. de; BOARI, C. A.; PICCOLI, R. H. Isolamento de coliformes, estafilococos e enterococos de leite cru provenientes de tanques de refrigeração por expansão comunitários: identificação, ação lipolítica e proteolítica. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 28, n. 3, p. 753-760, 2008. Disponível em: <https://www.scielo.br/pdf/cta/v28n3/a36v28n3.pdf>. Acesso em: 10 fev. 2020.

THORNTON, J. M.; OSBORNE, D. L. Antioxidant function of polyamines in human colon cancer cells demonstrated by fluorescence. *The FASEB Journal*, v. 26, n. 692.15, p. 71-73, 2012. Disponível em: <https://jccr.biomedcentral.com/articles/10.1186/1756-9966-30-95>. Acesso em: 16 abr. 2020.

TITTARELLI, F.; PERPETUINI, G.; DI GIANVITO, P.; TOFALO, R. Biogenic amines producing and degrading bacteria: A snapshot from raw ewes' cheese. **LWT Food Science and Technology**, London, v. 101, p. 1-9, 2019. Disponível em: <https://www.x-mol.com/paper/886552>. Acesso em: 10 fev. 2020.

TODOROV, S. D. What Bacteriocinogenic Lactic Acid Bacteria Do in the Milk? In: NERO, L. A.; CARVALHO, A. F. (Eds). **Raw Milk: Balance Between Hazards and Benefits**. Cambridge: Academic Press, 2019. cap. 8, p. 149-174.

TORO-FUNES, N.; BOSCH-FUSTÉ, J.; VECIANA-NOGUÉS, M. T.; IZQUIERDO-PULIDO, M.; VIDAL-CAROU, M. C. In vitro antioxidant activity of dietary polyamines. **Food Research International**, Barking, v. 51, n. 1, p. 141-147, 2013. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S096399691200508X>. Acesso em: 10 fev. 2020.

TORRACCA, B.; PEDONESE, F.; LÓPEZ, M. B.; TURCHI, B.; FRATINI, F.; NUVOLONI, R. Effect of Milk pasteurisation and of ripening in a cave on biogenic amine content and sensory properties of a pecorino cheese. **International Dairy Journal**, Barking, v. 61, p. 189-195, 2016. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0958694616301728>. Acesso em: 10 fev. 2020.

TOSI, F.; SANDRI, S.; TEDESCHI, G.; MALACARNE, M.; FOSSA, E. Variazioni di composizione e proprietà fisico-chimiche del Parmigiano-Reggiano durante La maturazione e in differenti zone della forma. **Scienza e Tecnica Lattiero-Casearia**, Parma, v. 59, n. 6, p. 507-528, 2008. Disponível em: https://www.researchgate.net/publication/237746972_Variazione_di_composizione_e_propriet%C3%A0_fisico-chimiche_del_Parmigiano_Reggiano_durante_la_maturazione_e_in_differenti_zone_della_forma. Acesso em: 10 fev. 2020.

UBALDO, J. C. S. R.; CARVALHO, A. F.; FONSECA, L. M.; GLORIA, M. B. A. Bioactive amines in Mozzarella cheese from Milk with varying somatic cell counts. **Food Chemistry**, London, v. 178, p. 229-235, 2015. Disponível em:

<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0308814615000989>. Acesso em: 10 fev. 2020.

URBACH, G. Contribution of lactic acid bacteria to flavour compound formation in dairy products. **International Dairy Journal**, Barking, v. 5, n. 8, p. 877–903, 1995. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/0958694695000372>. Acesso em: 03 jan. 2021.

VALE, R. C. **Influência do tipo de fermento nas características de queijo Minas artesanal do Serro-MG maturado em condições controladas**. 2018. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos)-Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Sudeste de Minas Gerais, Rio Pomba, 2018.

VALE, R. C.; RODRIGUES, M. P. J.; MARTINS, J. M. Influência do tipo de fermento nas características de queijo Minas artesanal do Serro-Minas Gerais, maturado em condições controladas. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, Juiz de Fora, v. 73, n. 2, p. 82-90, 2018. Disponível em: <https://www.revistadoilct.com.br/rilct/issue/view/65>. Acesso em: 10 fev. 2020.

VINDEROLA, G.; OUWEHAND, A.; SALMINEN, S.; VON WRIGHT, A. **Lactic Acid Bacteria: Microbiological and Functional Aspects**. Boca Raton, FL, USA: CRC Press, 2019.

WALLACE, H. M.; FRASER, A. V.; HUGHES, A. A perspective of polyamine metabolism. **The Biochemical Journal**, London, v. 376, n. 1, p.1-14, 2003. Disponível em: <https://portlandpress.com/biochemj/article-abstract/376/1/1/43932/A-perspective-of-polyamine-metabolism?redirectedFrom=fulltext>. Acesso em: 10 fev. 2020.

WILKINSON, M. G.; LAPOINTE, G. Invited review: Starter lactic acid bacteria survival in cheese: New perspectives on cheese microbiology. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v.103, n.12, p. 10963-10985, 2020. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0958694601001352>. Acesso em: 08 de jan. 2021.

YERLIKAYA, O. Probiotic potential and biochemical and technological properties of *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* strains isolated from raw milk and kefir grains. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 102, n. 1, p. 124-134, 2019. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30391179/>. Acesso em: 10 fev. 2020.

YILMAZ, M. I.; DEMIRHAN, B.; DEMIRHAN, B. E. Investigation of histamine levels in pasteurized, high heat-treated milk and types of Cheese. **Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences**, Oxford, v. 10, n. 2, p. 217-220, 2020. Disponível em: <https://office2.jmbfs.org/index.php/JMBFS/article/view/2648>. Acesso em: 10 fev. 2020.

YOON, Y.; LEE, S.; CHOI, K. H. Microbial benefits and risks of raw milk cheese. **Food Control**, Guildford, v. 63, n. 1, p. 201-215, 2016. Disponível em: <https://daneshyari.com/article/preview/4559153.pdf>. Acesso em: 10 fev. 2020.

ZAZZU, C.; ADDIS, M.; CAREDDA, M.; SCINTU, M. F.; PIREDDA, G.; SANNA, G. Biogenic Amines in Traditional *Fiore Sardo* PDO Sheep Cheese: Assessment, Validation and

Application of a RP-HPLC-DAD-UV Method. **Preprints**, v. 6, n. 1, p. 11, 2019. Disponível em: <https://www.preprints.org/manuscript/201901.0290/v1>. Acesso em: 10 fev. 2020.

ZHENG, J.; WITTOUCK, S.; SALVETTI, E.; FRANZ, C. M. A.; HARRIS, H. M. B.; MATTARELLI, P.; O'TOOLE, P. W.; POT, B.; VANDAMME, P.; WALTER, J.; WATANABE, K.; WUYTS, S.; FELIS, J. E.; GÄNZLE, M. G.; LEBEER, S. A taxonomic note on the genus *Lactobacillus*: Description of 23 novel genera, emended description of the genus *Lactobacillus* Beijerinck 1901, and union of *Lactobacillaceae* and *Leuconostocaceae*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Reading, v.70, n. 4, p. 2782-2858, 2020. Disponível em: <https://www.microbiologyresearch.org/content/journal/ijsem/10.1099/ijsem.0.004107>. Acesso em: 10 fev. 2020.

ZHOU, X.; GAO, J.; HUANG, Y.; FU, S.; CHEN, H. Antibiotic resistance pattern of *Klebsiella pneumoniae* and *Enterobacter sakazakii* isolates from powdered infant formula. **African Journal of Microbiological Research**, v. 5, n. 19, p. 3073-3077, 2011. Disponível em: https://www.researchgate.net/publication/266493955_Antibiotic_resistance_pattern_of_Klebsiella_pneumoniae_and_Enterobacter_sakazakii_isolates_from_powdered_infant_formula. Acesso em: 10 fev. 2020.

ANEXO I



Departamento de Tecnologia e Inspeção de Produtos de
Origem Animal
Escola de Veterinária UFMG
Av. Presidente Antônio Carlos 6627 – São Luiz, Belo Horizonte -
MG, 31270-901. Fone: (31) 3409- 2135



RESULTADO

ANÁLISES DE _____

Produtor:

CNPJ/CPF ou Cadastro produtor:

Endereço do Requerente:

Município/UF:

Telefone:

Email:

PROJETO:

Data da Produção:

Data da Validade:

Data do Recebimento:

Volume da amostra:

Temperatura da amostra: () Ambiente () Refrigerado

Início das análises:

Liberação das análises:

Análises Requeridas	Resultados	Metodologia

OBS:

Belo Horizonte, ____ de _____ 20__

Analista_____
Professor Coordenador do Projeto_____
Chefe do DTIPOA