

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

Gustavo Lucas Costa Valente

**Caracterização microbiológica e físico-química de água, leite cru, soro-fermento, *swabs* de superfícies e queijo Minas artesanal da região de Campo das Vertentes ao longo da maturação nas estações de seca e chuva**

**BELO HORIZONTE - MG  
2022**

Gustavo Lucas Costa Valente

**Caracterização microbiológica e físico-química de água, leite cru, soro-fermento, *swabs* de superfícies e queijo Minas artesanal da região de Campo das Vertentes ao longo da maturação nas estações de seca e chuva**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Ciência Animal.

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

Orientador: Marcelo Resende de Souza

Co-orientadores: Cláudia Freire de Andrade  
Morais Penna e Andréia Marçal da Silva

**BELO HORIZONTE - MG  
2022**

V154c Valente, Gustavo Lucas Costa, 1990-  
Caracterização microbiológica e físico-química de água, leite cru, soro-fermento, swabs de superfícies e queijo Minas artesanal da região de Campo da Vertentes ao longo da maturação nas estações de seca e chuva / Gustavo Lucas Costa Valente. – 2022.  
110 f: il.

Orientador: Marcelo Resende de Souza  
Coorientadores: Cláudia Freire de Andrade Morais Penna  
Andréia Marçal da Silva

Tese (Doutorado) apresentada à Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais para obtenção do título de Doutor.

Área de concentração: Tecnologia e Inspeção de Produtos de Origem Animal.  
Bibliografia: f. 87 a 106.

1. Saúde pública – Veterinária - Teses - 2. Leite – Análise - Teses - 3. Queijo – Teses – I. Souza, Marcelo Resende de - II. Penna, Cláudia Freire de Andrade Morais – III. Silva, Andréia Marçal da – IV. Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Veterinária – V. Título.

**CDD – 637**

Bibliotecária responsável Cristiane Patrícia Gomes – CRB2569  
Biblioteca da Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais



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

FOLHA DE APROVAÇÃO

GUSTAVO LUCAS COSTA VALENTE

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 25 de abril de 2022, pela banca constituída pelos membros:

Dr.(a). Marcelo Resende de Souza  
Presidente – Orientador(a)

Dr.(a). Felipe Machado de Sant Anna

Dr.(a). Elisa Helena Paz Andrade

Dr.(a). Carla Ferreira Soares

Dr.(a). Leticia Goulart de Oliveira



Documento assinado eletronicamente por **Marcelo Resende de Souza, Professor do Magistério Superior**, em 25/04/2022, às 19:57, 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 **Elisa Helena Paz Andrade, Professora do Magistério Superior**, em 25/04/2022, às 19:59, 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 **Carla Ferreira Soares, Professora do Magistério Superior**, em 25/04/2022, às 20:01, 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 **Leticia Goulart de Oliveira, Usuário Externo**, em 26/04/2022, às 15:55, 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 **Felipe Machado de Sant'Anna, Usuário Externo**, em 04/05/2022, às 12:34, 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](https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0), informando o código verificador **1402099** e o código CRC **897F67F3**.

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus pelo dom da vida e sabedoria.

Aos meus pais, Sandra e Fernando, pela base, incentivo e orientação fornecida. À minha irmã, Stefânia, por todo o apoio. À Olívia pelos momentos de descontração.

À Ursula por estar sempre ao meu lado em todos os momentos, me ajudando e apoiando em todas as decisões, e a toda sua família.

Ao professor Marcelo pela orientação, conhecimentos compartilhados, pelo auxílio durante coletas e análises e por ser um exemplo de pessoa e de profissional no qual me espelho.

À professora Andréia pela co-orientação e todo auxílio prestado na coleta das amostras.

À Cláudia pela co-orientação e por sempre demonstrar interesse em contribuir com o projeto.

Aos professores do Departamento de Tecnologia e Inspeção de Produtos de Origem Animal (DTIPOA) por todos os ensinamentos. Aos funcionários do DTIPOA pelos auxílios prestados, em especial ao César, Laurindo, Viviane, Cosme, Isabella, Marco Antonio e Milton.

Aos produtores de queijo Minas artesanal do Campo das Vertentes por aceitarem participar do estudo e por gentilmente nos receber e ceder as amostras.

Aos funcionários da EPAMIG, Daniel e Marlene, e a profa. Ana Paula e seus alunos da UFSJ por disponibilizarem a estrutura laboratorial em São João del-Rei e por todo auxílio prestado na coleta e transporte dos queijos.

Aos colegas de laboratório e pós-graduação, Rommel, Naiara, Ranier, João Paulo, Thamiris e Ana Carolina; à aluna de iniciação científica Raissa; às estagiárias Leila, Beatriz e Mariana; e às funcionárias da EPAMIG, Cristiane e Jaqueline, por todo auxílio durante etapa laboratorial.

À equipe do LabUFMG pela cooperação da realização de análises do leite cru.

Ao colegiado de pós-graduação e a CAPES, pela bolsa concedida.

## RESUMO

O queijo Minas artesanal (QMA) é tradicionalmente produzido no estado de Minas Gerais. Além de ter importância cultural e histórica, a elaboração desse produto também se destaca pelo aspecto econômico, uma vez que o queijo representa uma das principais fontes de renda para várias famílias. Dentre as regiões do Estado, oficialmente reconhecidas para produção de QMA, há poucos estudos realizados em Campo das Vertentes. A produção do QMA se caracteriza pela utilização de leite cru, coalho, soro-fermento endógeno (conhecido popularmente como “pingo”) e técnicas tradicionais utilizadas por cada queijaria. Entretanto, a qualidade desse produto pode ser influenciada por fatores como atributos das matérias primas, adoção às Boas Práticas de Fabricação (BPF) e condições climáticas. Dessa forma, torna-se importante o estudo de caracterização do QMA da região de Campo das Vertentes ao longo de sua maturação em diferentes épocas do ano. Baseado nessas informações, o objetivo desse trabalho foi realizar a caracterização microbiológica e físico-química deste queijo ao longo de 60 dias de maturação, de suas matérias-primas e de superfícies relacionadas à produção (bancadas e prateleiras de maturação), considerando as duas estações climáticas na região: seca e chuvosa. Em geral, as matérias primas (água, leite cru e fermento endógeno) apresentaram qualidade adequada e não foram significativamente influenciadas pela estação do ano. Micro-organismos desejáveis (bactérias ácido-lácticas) e indesejáveis (coliformes e *Staphylococcus* spp.) foram detectados nas superfícies de produção. A qualidade físico-química dos queijos foi influenciada pelo período de maturação, mas não variou significativamente em função da época do ano. As contagens microbianas dos queijos não foram significativamente influenciadas pelo período de maturação. Em relação à época do ano, as contagens de coliformes a 45 °C foram estatisticamente maiores no período chuvoso e as de bolores e leveduras foram mais elevadas no período seco. Os resultados atenderam aos padrões exigidos pela legislação oficial para inspeção sanitária dos queijos apenas aos 60 e 22 dias de maturação nas estações chuvosa e seca, respectivamente. Os parâmetros que impossibilitaram que os queijos atendessem aos padrões mais precocemente foram coliformes a 30 °C (período chuvoso) e *Staphylococcus* coagulase positivo (período seco). A adoção aos preceitos de BPF durante a elaboração dos queijos e a manipulação dos produtos de forma higiênica ao longo da maturação podem minimizar a ocorrência de contaminações/recontaminações e, conseqüentemente, contribuir para que os queijos atendam aos padrões mais brevemente.

Palavras chave: inspeção, qualidade, higiene, saúde pública, derivados lácteos

## ABSTRACT

Minas artisanal cheese (MAC) is traditionally produced in the state of Minas Gerais. In addition to its cultural and historical importance, the making of this product also stands out for its economic importance, since this is one of the main sources of income for many families. Among the regions of the State, recognized for the production of MAC, few studies were carried out in *Campo das Vertentes*. The production of MAC is characterized by the use of raw milk, rennet, endogenous starter cultures (popularly known as “pingo”) and traditional techniques used by each cheesemaker. However, the quality of this product can be influenced by factors such as the quality of raw materials, adoption of Good Manufacturing Practices (GMP) and weather conditions. Thus, it is important to study the characterization of cheeses throughout its ripening time at different seasons. Based on this information, the aim of this survey was to carry out the microbiological and physical-chemical characterization of Minas artisanal cheeses over 60 days of ripening, its raw materials and processing surface (benches and ripening shelves) during dry and rainy seasons in the *Campo das Vertentes* region. In general, the raw materials (water, raw milk and endogenous starter cultures) were of adequate quality and the results were not significantly influenced by the season. Desirable (lactic acid bacteria) and undesirable (coliforms and *Staphylococcus* spp.) microorganisms were detected on the surfaces. The physical-chemical quality of the cheeses was influenced by the ripening stage, but did not vary significantly according to the season. Bacterial counts of cheeses were not significantly influenced by the ripening stage. Regarding the season, the counts of coliform at 45 °C were statistically higher in the rainy season and the counts of molds and yeasts were statistically higher in the dry season. The results met the requirements of the official legislation for sanitary inspection of cheeses only at 60 and 22 days of ripening in the rainy and dry seasons, respectively. The parameters that prevented the cheeses from meeting the standards earlier were coliforms at 30 °C (rainy season) and coagulase positive *Staphylococcus* (dry season). The adoption of GMP during the production of cheeses and the hygienic handling of the cheeses during ripening can minimize the occurrence of contamination/recontamination and, consequently, certify that the cheeses meet the standards briefly.

Keywords: inspection, quality, hygiene, public health, dairy products.

---

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

---

Figura 1.	Regiões legalmente reconhecidas pelo Instituto Mineiro de Agropecuária como produtoras de queijo Minas artesanal até 2021.....	19
Figura 2.	Localização geográfica dos municípios legalmente reconhecidos como produtores de queijo Minas artesanal na mesorregião de Campo das Vertentes-MG.....	22
Figura 3.	Temperatura ambiental média de câmara de maturação de quatro queijarias registrada ao longo de 60 dias de maturação de queijo Minas artesanal da mesorregião do Campo das Vertentes no período seco do ano de 2021.....	57
Figura 4.	Umidade relativa do ar média de câmara de maturação de quatro queijarias registrada ao longo de 60 dias de maturação de queijo Minas artesanal da mesorregião do Campo das Vertentes no período seco do ano de 2021.....	58

---



---

## LISTA DE TABELAS

---

Tabela 1.	Distribuição de produtores de queijo Minas artesanal por região, cadastro ao sistema de inspeção, produção e geração de empregos de acordo com dados publicados entre 2019 e 2022.....	20
Tabela 2.	Períodos mínimos de maturação para o queijo Minas Artesanal de cada região estabelecidos por Portarias do Instituto Mineiro de Agropecuária.....	24
Tabela 3.	Parâmetros microbiológicos e físico-químicos para água utilizada na produção de queijo Minas artesanal.....	27
Tabela 4.	Parâmetros microbiológicos e físico-químicos para o leite cru utilizado na produção de queijo Minas artesanal.....	30
Tabela 5.	Média e coeficiente de variação das contagens de micro-organismos presentes nas superfícies de utensílios de madeira utilizados para produção de queijo Minas artesanal.....	32
Tabela 6.	Padrões sugeridos para concentração microbiana em superfícies relacionadas ao processamento de alimentos.....	32
Tabela 7.	Padrões microbiológicos e físico-químicos para inspeção sanitária de queijo Minas artesanal.....	33
Tabela 8.	Testes de comparação aplicados sobre os resultados das análises microbiológicas de água, soro-fermento, leite cru e queijo.....	56
Tabela 9.	Testes de comparação aplicados sobre os resultados das análises físico-químicas de água, soro-fermento, leite cru e queijo.....	56
Tabela 10.	Medianas de parâmetros microbiológicos da água de queijarias (n =4) registradas para produção de queijo Minas artesanal da região do Campo das Vertentes – MG, durante as estações de seca e chuva.....	58
Tabela 11.	Médias e coeficientes de variação (CV) de parâmetros físico-químicos da água de queijarias registradas (n=4) para produção de queijo Minas artesanal da região do Campo das Vertentes – MG, durante as estações de seca e chuva.....	59
Tabela 12.	Percentual de queijarias registradas (n=4) de produção de queijo Minas artesanal da região do Campo das Vertentes – MG, apresentando qualidade físico-química e microbiológica de água em acordo com a Portaria GM/MS nº 888, durante as estações de seca e chuva.....	61
Tabela 13.	Medianas de parâmetros microbiológicos do soro-fermento usado em queijarias registradas (n=4) para produção de queijo Minas artesanal da região do Campo das Vertentes – MG, durante as estações de seca e chuva.....	62
Tabela 14.	Médias e coeficientes de variação (CV) de parâmetros físico-químicos do soro-fermento usado em queijarias registradas (n=4) para produção de queijo Minas artesanal da região do Campo das Vertentes – MG, durante as estações de seca e chuva.....	63
Tabela 15.	Médias e medianas de parâmetros microbiológicos e contagem de células somáticas do leite cru usado em queijarias registradas (n=4) para produção de queijo Minas artesanal da região do Campo das Vertentes – MG, durante as estações de seca e chuva.....	65
Tabela 16.	Médias e coeficientes de variação (CV) de parâmetros físico-químicos do leite cru usado em queijarias registradas (n=4) para produção de queijo Minas artesanal da região do Campo das Vertentes – MG, durante as estações de seca e chuva.....	68
Tabela 17.	Percentual de queijarias registradas (n=4) de produção de queijo Minas artesanal da região do Campo das Vertentes – MG, com padrões físico-químicos, microbiológicos e contagem de células somáticas de leite cru em acordo com a o Decreto nº 42.645/2002, durante as estações de seca e chuva.....	69
Tabela 18.	Contagens de micro-organismos em superfícies de bancadas de produção de queijarias registradas (n=4) para produção de queijo Minas artesanal da região do Campo das Vertentes – MG, durante as estações de seca e chuva.....	70

---

---

Tabela 19.	Concentração de micro-organismos em prateleiras de queijos com 22 dias de maturação em queijarias registradas (n=4) para produção de queijo Minas artesanal da região do Campo das Vertentes – MG, durante as estações de seca.....	72
Tabela 20.	Medianas de parâmetros microbiológicos pesquisados durante a maturação de queijos Minas artesanais produzidos em queijarias registradas (n=4) no Campo das Vertentes - MG, nas estações seca e chuvosa.....	73
Tabela 21.	Médias e desvios-padrão de parâmetros físico-químicos durante maturação de queijos Minas artesanais produzidos em queijarias registradas (n=4) no Campo das Vertentes - MG, nas estações seca e chuvosa.....	78
Tabela 22.	Percentual de amostras de queijo Minas artesanal de Campo das Vertentes (n=4) em conformidade com o Decreto nº 44.864/2008 e Portaria nº 146/1996 ao longo da maturação e em diferentes épocas do ano.....	82
Tabela 23.	Identificação por espectrometria de massas MALDI-TOF de bactérias ácido-láticas isoladas de soro-fermento, leite cru, <i>swabs</i> e queijo Minas artesanal em diferentes períodos de maturação e nas duas estações do ano.....	83

---

---

**LISTA DE QUADROS**

---

Quadro 1. Microrregiões e municípios pertencentes à mesorregião do Campo das Vertentes-MG.....	21
--	----

---

---

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

---

$\mu\text{L}$	Microlitro
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
BAL	Bactérias Ácido-Láticas
BPA	Boas Práticas Agropecuárias
BPF	Boas Práticas de Fabricação
BPLS	Ágar Verde Brilhante Vermelho de Fenol Lactose Sacarose
$^{\circ}\text{C}$	Graus Celsius
$\text{Ca}^{+2}$	Íons Cálcio
$\text{CaCO}_3$	Carbonato de Cálcio
CCS	Contagem de Células Somáticas
$\text{Cl}_2$	Cloro
$\text{cm}^2$	Centímetros quadrados
$\text{CO}_2$	Dióxido de Carbono
CPP	Contagem Padrão em Placas
CV	Coefficiente de Variação
$^{\circ}\text{D}$	Graus Dornic
DTIPOA	Departamento de Tecnologia e Inspeção de Produtos de Origem Animal
EC	<i>Escherichia coli</i>
EMATER	Empresa de Assistência Técnica e Extensão Rural
EPAMIG	Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais
ESD	Extrato Seco Desengordurado
EST	Extrato Seco Total
EV	Escola de Veterinária
g	Gramma
GES	Gordura no Extrato Seco
GMP	<i>Good Manufacturing Practices</i>
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
IgE	Imunoglobulina E
IMA	Instituto Mineiro de Agropecuária
IPHAN	Instituto do Patrimônio Histórico e Artístico Nacional
LabUFMG	Laboratório de Análise da Qualidade do Leite
MAC	<i>Minas artisanal cheese</i>
MALDI-TOF	<i>Matrix Assisted Laser Desorption Ionization - Time Of Flight</i>
MAPA	Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
MG	Minas Gerais
mg	Miligrama
$\text{Mg}^{+2}$	Íon Magnésio
mL	Mililitro
MRS	Man-Rogosa-Sharpe
n $^{\circ}$	Número
NMP	Número Mais Provável
PCA	<i>Plate Count Agar</i>
QMA	Queijo Minas Artesanal
RIISPOA	Regulamento da Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal
rRNA	Ácido ribonucleico ribossômico
RPM	Rotações por minuto
SEAPA	Secretaria de Estado de Agricultura, Pecuária e Abastecimento
SISBI - POA	Sistema Brasileiro de Inspeção de Produtos de Origem Animal
SisGen	Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado
t	Tonelada
UFC	Unidade Formadora de Colônia
UFMG	Universidade Federal de Minas Gerais
UFSJ	Universidade Federal de São João del-Rei

---

---

## SUMÁRIO

<b>RESUMO</b> .....	5
<b>ABSTRACT</b> .....	6
<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	14
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	16
2.1. Objetivo geral.....	16
2.2. Objetivos específicos.....	16
<b>3. REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	17
3.1. Queijos artesanais produzidos no Brasil e em Minas Gerais.....	17
3.2. Queijo Minas artesanal (QMA).....	18
3.2.1. Aspectos econômicos.....	19
3.2.2. Região do Campo das Vertentes.....	20
3.2.3. Aspectos legais.....	22
3.2.3.1. Regulamentação da produção e comercialização.....	22
3.2.3.2. Regulamentação do período de maturação.....	23
3.2.4. Influência do período de maturação sobre a qualidade de queijos artesanais.....	24
3.2.5. Influência da época do ano sobre a qualidade de queijos artesanais.....	26
3.3. Qualidade microbiológica e físico-química da água.....	26
3.4. Qualidade microbiológica e físico-química do soro-fermento.....	28
3.5. Qualidade microbiológica e físico-química do leite cru.....	28
3.6. Biofilmes relacionados à produção de queijos.....	30
3.7. Qualidade microbiológica do queijo Minas artesanal.....	32
3.7.1. Bactérias ácido-lácticas.....	33
3.7.2. Bolores e leveduras.....	34
3.7.3. Coliformes a 30 °C e 45 °C.....	35
3.7.4. <i>Staphylococcus</i> spp.....	36
3.7.5. <i>Salmonella</i> spp.....	38
3.8. Qualidade físico-química do queijo Minas artesanal.....	38
3.8.1. Acidez e pH.....	39
3.8.2. Umidade e extrato seco total.....	39
3.8.3. Resíduo mineral fixo e cloretos.....	40
3.8.4. Gordura.....	41
3.8.5. Proteínas e compostos nitrogenados.....	42
<b>4. MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	44
4.1. Locais e épocas de coletas de amostras.....	44
4.2. Amostragem de água, leite cru, soro-fermento, <i>swabs</i> de superfícies e queijo Minas artesanal.....	44
4.3. Análises microbiológicas.....	45
4.3.1. Água.....	45
4.3.2. <i>Swabs</i> de superfície.....	45
4.3.3. Soro-fermento.....	45
4.3.4. Leite cru.....	46
4.3.5. Queijo Minas artesanal.....	46
4.4. Metodologias utilizadas nas avaliações de parâmetros microbiológicos de qualidade.....	46
4.4.1. Contagem de micro-organismos mesófilos aeróbios.....	46
4.4.2. Número mais provável de coliformes a 30 °C e 45 °C.....	46
4.4.3. Contagem e identificação de bactérias ácido-lácticas.....	47
4.4.4. Contagem de <i>Staphylococcus</i> spp. e teste de coagulase.....	47
4.4.5. Pesquisa de bolores e leveduras.....	48
4.4.6. Pesquisa de <i>Salmonella</i> spp.....	48
4.4.7. Contagem padrão em placas e contagem de células somáticas.....	49
4.4.8. Pesquisa de inibidores de crescimento microbiano.....	49
4.5. Análises físico-químicas.....	49
4.5.1. Água.....	49

---

---

4.5.1.1.	Acidez.....	49
4.5.1.2.	Alcalinidade.....	50
4.5.1.3.	Cloro residual.....	50
4.5.1.4.	Cloretos.....	50
4.5.1.5.	Dureza.....	51
4.5.1.6.	pH.....	51
4.5.2.	Soro-fermento.....	51
4.5.2.1.	Acidez titulável e pH.....	51
4.5.2.2.	Teor de cloretos.....	51
4.5.3.	Leite cru.....	52
4.5.4.	Queijo Minas artesanal.....	52
4.5.4.1.	Teor de umidade.....	52
4.5.4.2.	Resíduo mineral fixo.....	53
4.5.4.3.	Teor de cloretos.....	53
4.5.4.4.	Teor de gordura.....	53
4.5.4.5.	Gordura no extrato seco.....	54
4.5.4.6.	Teor de proteína.....	54
4.5.4.7.	Acidez titulável e pH.....	55
4.6.	Delineamento experimental e análise estatística.....	55
4.7.	Extensão rural.....	56
<b>5.</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	<b>57</b>
5.1.	Variações de temperatura e umidade nas queijarias ao longo da maturação.....	57
5.2.	Qualidade microbiológica e físico-química da água.....	58
5.3.	Qualidade microbiológica e físico-química de soro-fermento.....	61
5.4.	Qualidade microbiológica e físico-química de leite cru.....	65
5.5.	Microbiologia de <i>swabs</i> de superfícies.....	70
5.6.	Qualidade microbiológica de queijo Minas artesanal durante maturação.....	72
5.7.	Qualidade físico-química de queijo Minas artesanal durante maturação.....	77
5.8.	Adequação dos queijos à legislação.....	81
5.9.	Identificação de bactérias ácido-lácticas isoladas de soro-fermento, leite cru, <i>swabs</i> e queijos.....	83
5.10.	Extensão rural.....	84
<b>6.</b>	<b>CONCLUSÃO</b> .....	<b>85</b>
<b>7.</b>	<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS</b> .....	<b>86</b>
<b>8.</b>	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	<b>87</b>
<b>9.</b>	<b>ANEXOS</b> .....	<b>107</b>

---

## 1. INTRODUÇÃO

Minas Gerais é o estado do Brasil de maior destaque quanto à pecuária leiteira. Como reflexo dessa aptidão, o estado também apresenta grande tradição na produção de queijos artesanais. Dentre esses, o queijo Minas artesanal (QMA) tem grande relevância no cenário nacional e internacional, devido suas marcantes e agradáveis características sensoriais. Tais fatores contribuem para que o QMA da vez mais se popularize, ganhando espaço na mídia e na mesa dos consumidores.

Dentre as dez mesorregiões que legalmente são reconhecidas como produtoras de QMA, Campo das Vertentes é considerada uma das mais tradicionais. Alguns registros históricos datados do período colonial sugerem que esse pode ter sido o primeiro local do Brasil a produzir queijos. Localizado no centro sul de Minas Gerais, a região de Campo das Vertentes apresenta uma grande aptidão agropecuária, com destaque para a bovinocultura leiteira destinada à produção de queijos.

A produção de QMA geralmente é feita em pequena escala, realizada principalmente por agricultores familiares que encontram nessa atividade sua principal fonte de renda. O caráter artesanal de produção contribui para que cada queijo tenha suas particularidades. Cada produtor/queijaria tem sua maneira própria de produzir os queijos, utilizando “segredos” mantidos dentro da família ao longo de gerações, que contribui para a diversidade das características sensoriais desse produto. Além disso, aspectos edafoclimáticos da região do qual o queijo se origina, bem como a diversificação de algumas etapas de produção também determinam diferenças de composição química, qualidade microbiológica e aspectos sensoriais desses queijos.

Da perspectiva de saúde pública, os queijos artesanais podem apresentar alguns perigos. A utilização do leite cru e soro-fermento como matérias-primas e o alto grau de manipulação dessa matriz alimentar podem contribuir para a presença de uma contaminação microbiana não desejável no produto, que potencialmente pode se relacionar a ocorrências de infecções, toxinfecções e intoxicações alimentares. Além disso, micro-organismos presentes em superfícies relacionadas à elaboração dos queijos, como bancadas e prateleiras de maturação, também podem ser fontes de contaminação e/ou recontaminação dos produtos.

Por essa razão, legislações de âmbito nacional e estadual estabeleceram que queijos artesanais elaborados com leite cru, como o QMA, devem ser produzidos seguindo conceitos e procedimentos preconizados pelas Boas Práticas Agropecuárias (BPA) e Boas Práticas de Fabricação (BPF), além de ser submetidos a um período de maturação específico para redução dos perigos microbiológicos. As mudanças físico-químicas e microbiológicas que ocorrem no queijo durante a maturação contribuem para que esse meio se torne inapropriado para o estabelecimento e desenvolvimento de micro-organismos com potencial deteriorante ou patogênico, tornando essa etapa de produção fundamental para contribuir com a segurança do alimento.

Nesse sentido, o estudo das características físico-químicas e microbiológicas do queijo durante a maturação se torna muito importante para determinar o tempo adequado para que o produto tenha características sensoriais típicas e qualidade microbiológica esperada. Esses resultados, além de fornecer dados às agências de inspeção sanitária, também permitem diagnosticar pontos da produção que podem comprometer a qualidade do produto como, por exemplo, eventos de contaminação cruzada e/ou recontaminação. Além disso, para toda cadeia que cerca a produção de queijos artesanais é interessante a busca pela produção de queijos com reduzido período de maturação. Isso permite com que as queijarias escoem sua produção mais rapidamente ao mesmo tempo em que atende o anseio do mercado consumidor brasileiro que, em sua maioria, tem uma preferência por queijos com menor tempo de maturação.

Desta forma, o estudo do comportamento dos parâmetros físico-químicos e microbiológicos do QMA produzido na mesorregião do Campo das Vertentes, em duas estações do ano, se faz necessário para determinar o período de maturação mais adequado para esse produto, considerando os parâmetros de qualidade higiênico-sanitária estabelecidos pela legislação.



## 2. OBJETIVOS

### 2.1. Objetivo geral

Realizar a caracterização microbiológica e físico-química do QMA da região do Campo das Vertentes, maturado nas queijarias sob temperatura e umidade ambientes, em duas épocas do ano (seca e chuvosa).

### 2.2. Objetivos específicos

- Conhecer o perfil microbiológico e físico-químico da água, do soro-fermento e de QMA da região de Campo das Vertentes.
- Conhecer a contagem de células somáticas e o perfil microbiológico e físico-químico do leite cru utilizado na produção dos queijos.
- Avaliar a influência da qualidade das matérias-primas, do processo de maturação e da época do ano sobre a qualidade microbiológica dos queijos maturados sob temperatura ambiente nas queijarias.
- Verificar a concentração de micro-organismos desejáveis e indesejáveis nas superfícies das bancadas de produção e das prateleiras de maturação de QMA.
- Subsidiar aos órgãos de inspeção sanitária informações para se determinar o período mínimo de maturação do QMA da região de Campo das Vertentes, considerando os padrões especificados nas legislações estaduais e federais vigentes.
- Identificar a espécie de micro-organismos isolados por espectrometria de massas.
- Criar banco de bactérias isoladas de leite, soro-fermento, queijos, bancadas de produção e prateleiras de maturação da região para futuros estudos.
- Reunir com os produtores participantes do estudo e discutir os resultados gerais e individuais obtidos, propondo, caso necessário, alterações higiênico-sanitárias nas etapas de elaboração e maturação dos queijos.

### 3. REVISÃO DE LITERATURA

#### 3.1. Queijos artesanais produzidos no Brasil e em Minas Gerais

Acredita-se que as práticas de produção e beneficiamento do leite no Brasil tenham sido trazidas pelos colonizadores. Tal alegação se fundamenta pela ausência de registros históricos sobre a atividade da pecuária leiteira pelos indígenas, uma vez que não existiam ruminantes leiteiros no país. Com o fim do período de extrativismo do pau-brasil e início da monocultura da cana-de-açúcar, iniciou-se, de forma rudimentar, a criação dos primeiros animais objetivando a exploração leiteira (Brandão *et al.*, 1943). Há registros datados do século XVIII sobre a importação massiva de animais como vacas, ovelhas e cabras, bem como a produção de derivados lácteos. Inicialmente, o leite era usado para a produção de queijos e manteiga, pois essa era uma estratégia que permitia conservar por mais tempo as propriedades nutritivas do leite. No mesmo período começou a se destacar a produção do requeijão do sertão, também conhecido como queijo manteiga, elaborado por indivíduos escravizados. Atualmente, a produção desse queijo ainda se encontra presente em alguns estados do Norte e Nordeste (Southey, 1819; Cavalcante e Costa, 2005). Ainda no Nordeste, a produção do queijo coalho tem sido realizada há 150 anos. A origem do queijo coalho se relaciona ao acondicionado do leite em bolsas elaboradas a partir de estômago de animais, chamadas popularmente de “mutalão” (Cavalcante *et al.*, 2007).

O queijo do Marajó, originário da região Norte do Brasil, é produzido de forma artesanal há mais de 200 anos no arquipélago de mesmo nome. A sua produção se caracteriza pela coagulação do leite por acidificação (Pinto *et al.*, 2016). No outro extremo do país, na região Sul, há grande tradição na produção do queijo Colonial, elaborado a partir de técnicas trazidas por imigrantes advindos, principalmente, da Itália e da Alemanha nos séculos XIX e XX (Wilkinson *et al.*, 2017). Além do queijo Colonial, tais imigrantes contribuíram para a introdução de variedades de outros queijos artesanais, como Serrano, Diamante, Porongo e *Kochkäse*. No Centro-oeste brasileiro, o estado do Mato Grosso do Sul se destaca quanto à produção do queijo artesanal caipira (Kamimura *et al.*, 2019).

Minas Gerais é o estado brasileiro de maior destaque em relação à pecuária leiteira (IBGE, 2020). Da mesma forma, também é observada uma grande tradição de produção de queijos artesanais. Na região do Vale do Jequitinhonha, há uma versão nacional do queijo italiano *caccio cavalo*, chamado de queijo Cabacinha. Elaborado a partir de filamentos da massa, o queijo é pendurado durante o processo de secagem e adquire o formato que remete às cabaças (Santos Filho *et al.*, 2016). Em meados de 1920, a família italiana Poppa se estabeleceu no município de Alagoa, região da Serra da Mantiqueira. Desde então iniciou-se a tradição na produção do queijo Parmesão artesanal, também conhecido como queijo da Mantiqueira e queijo d’Alagoa. Ao norte do estado também há a produção de uma diversidade de queijos artesanais, como requeijão de corte (que pode se apresentar em três variedades distintas: o branco, o com raspas e o moreno) e o queijo artesanal da Serra Geral (Saraiva, 2018).

Apesar da diversidade de queijos artesanais produzidos em Minas Gerais, o QMA se apresenta como o principal e mais destacado queijo elaborado de forma artesanal no estado.

### 3.2. Queijo Minas artesanal (QMA)

O QMA é um dos mais antigos e tradicionais queijos produzidos no Brasil. Acreditava-se que as técnicas aplicadas durante sua elaboração tivessem sido trazidas pelos colonizadores, devido a semelhanças entre esse processo e o de produção do queijo da Serra da Estrela em Portugal (Meneses, 2006). Entretanto, o queijo da Serra da Estrela apresenta algumas particularidades que o distingue do QMA, como a utilização do leite de ovelhas da raça bordaleira e de coagulantes de origem vegetal, como a flor do cardo (Guiné *et al.*, 2015). Outra vertente histórica atribui a origem das técnicas de produção do QMA aos imigrantes vindos do arquipélago de Açores, mais especificamente das ilhas de Pico e São Jorge, que se estabeleceram em Minas Gerais no século XVIII. Nessas localidades, eram produzidos queijos artesanais maturados a partir do leite cru coagulado pela ação do coalho de origem animal (Netto, 2011).

Cada queijaria adota peculiaridades durante as etapas de produção de QMA. Tais técnicas têm sido passadas a gerações e são responsáveis pelas características únicas de cada produto. Associado a isso, aspectos geoclimáticos de cada região podem influenciar diretamente os atributos dos queijos, determinando seu *terroir* (Meneses, 2006). Apesar de tais particularidades, de uma forma geral a produção de QMA respeita uma série de procedimentos e etapas.

O processo de obtenção do QMA é caracterizado pela utilização do leite cru coagulado pela ação do coalho e adicionado de soro-fermento. O “pingo”, como popularmente esse soro-fermento é denominado, origina-se do soro resultante dos processos de enformagem e salga da massa dos queijos, sendo coletado e utilizado como fermento na produção de queijos do dia seguinte. O modo peculiar de produção do QMA apresenta grande importância cultural e histórica no contexto mineiro e, por causa disso, ele foi reconhecido pelo Inventário Nacional de Referências Culturais do Instituto do Patrimônio Histórico e Artístico Nacional (IPHAN) como patrimônio imaterial (IPHAN, 2014).

Atualmente, o Instituto Mineiro Agropecuário (IMA) reconhece legalmente dez regiões do estado como produtoras de QMA, conforme pode ser observado na figura 1. As regiões que, até o momento, receberam o reconhecimento legal como produtoras de QMA são (ordem cronológica): Serro, Araxá, Canastra, Cerrado, Campo das Vertentes, Triângulo Mineiro, Serra do Salitre, Serras de Ibitipoca, Diamantina e Entre Serras da Piedade ao Caraça (Minas Gerais, 2002a; Minas Gerais, 2003; Minas Gerais, 2004; Minas Gerais, 2007; Minas Gerais, 2009; Minas Gerais, 2014a; Minas Gerais, 2014b; Minas Gerais, 2020a; Minas Gerais, 2022a; Minas Gerais, 2022b).

Além da importância cultural e história, o QMA também representa uma importante fonte de renda a essas regiões.



Figura 1. Regiões legalmente reconhecidas pelo Instituto Mineiro de Agropecuária como produtoras de queijo Minas artesanal até 2021.

Fonte: Arte do Queijo (2021)

### 3.2.1. Aspectos econômicos

De acordo com dados referentes ao ano de 2020, Minas Gerais foi o estado brasileiro que mais produziu leite, cerca de 9,7 bilhões de litros, representando 27,4 % da produção nacional (IBGE, 2020). É também o maior produtor de queijos do Brasil, atingindo a marca de cerca de 85 mil toneladas/ano de queijos artesanais, o que representa 40 % dos queijos produzidos nacionalmente. A atividade engloba cerca de 30 mil famílias, que encontra na produção de queijos a principal fonte de renda familiar (EMATER, 2021).

A cadeia do QMA se caracteriza, em geral, pela pequena escala de produção. Apesar disso, a produção de queijos pode ser considerada mais rentável que a venda do leite para um laticínio. Pinilla *et al.* (2018) mostraram que 91 % da receita oriunda do comércio de leite fluido foram usados para cobrir os custos de produção. Considerando a produção de queijos, essa média foi de 62 %. A diferença permitiu com que os produtores tivessem maior lucro operacional.

Em Minas Gerais, são cerca de três mil agroindústrias produtoras de QMA, com produção superior a 21 mil toneladas/ano, o que representa aproximadamente 62 % da produção de queijos artesanais. Todavia, a maioria dos produtores de QMA ainda se encontra em um cenário de informalidade: apenas pequena parcela dos produtores são considerados certificados, cadastrados e/ou registrados (EMATER, 2022).

O processo de certificação compreende a participação dos produtores no programa da Gerência de Certificação do IMA, denominado “Certifica Minas”. O programa institui a adoção de medidas que visam assegurar a qualidade dos produtos e a sustentabilidade do sistema de produção, consequentemente favorecendo a inserção dos produtores no mercado. Em todo o Estado, 24 produtores de QMA estão vinculados ao “Certifica Minas” (Minas Gerais, 2018a; Minas Gerais, 2022c).

O cadastramento de produtores de QMA diz respeito a uma habilitação sanitária das queijarias, realizada pela Gerência de Inspeção de Produtos de Origem Animal do IMA. O cadastramento permite que as queijarias comercializem seus produtos no território mineiro. Atualmente, 177 produtores de QMA se encontram cadastrados na GIP (Minas Gerais, 2019; Minas Gerais, 2022d).

O registro implica na concessão, pelo IMA, do “Selo ARTE” às queijarias cadastradas. A adoção a este selo permite aos produtores o livre comércio em todo território nacional, garantindo aos consumidores a aquisição de produtos artesanais de qualidade e com segurança. O estado de Minas Gerais conta com 71 produtores de QMA registrados com o “Selo ARTE” no presente momento (Brasil, 2018; Minas Gerais, 2022d).

O número de produtores de QMA, incluindo os certificados/cadastrados/registrados no IMA, bem como dados de produção podem ser observados na tabela 1.

Tabela 1. Distribuição de produtores de queijo Minas artesanal por região, cadastro ao sistema de inspeção, produção e geração de empregos de acordo com dados publicados entre 2019 e 2022

Região	Número de produtores	Produtores cadastrados	Produtores registrados	Produtores certificados	Produção (t/ano)	Empregos diretos
Araxá	943	10	8	3	2.755	2.640
Campo das Vertentes	-	-	5	4	-	-
Canastra	1.529	39	13	1	5.787	4.281
Cerrado	6.112	20	1	3	17.357	17.582
Serra do Salitre	-	13	1	-	-	-
Serras da Ibitipoca	-	-	1	-	-	-
Serro	881	89	30	13	3.106	2.290
Triângulo	-	5	4	-	-	-
Sem região definida	-	1	9	-	-	-
<b>TOTAL</b>	9.465	177	72	24	29.005	26.793

(EMATER, 2019; Minas Gerais, 2022a; Minas Gerais, 2022c)

Além do impacto econômico direto atribuído à produção e comercialização do QMA, a atividade também se destaca pelo potencial turístico que é capaz de promover. Medeiros *et al.* (2017) afirmaram que o QMA pode ser utilizado como um “*souvenir* gastronômico”. Dessa forma, ele passa a representar uma manifestação cultural e identitária da região, sendo esses elementos fundamentais e estratégicos na elaboração de uma “marca local”.

### 3.2.2. Região do Campo das Vertentes

O Campo das Vertentes é uma das 12 mesorregiões que formam o estado de Minas Gerais, sendo composta por 36 municípios, listados no quadro 1. Geograficamente, a mesorregião é dividida em três microrregiões, nomeadas de acordo com o principal município nelas presentes: Barbacena, Lavras e São João del-Rei (IBGE, 2010). De acordo com dados referentes ao ano de 2017, a mesorregião do Campo das Vertentes tem grande tradição na pecuária. O rebanho leiteiro da região atingiu a marca de aproximadamente 463 mil cabeças que produziram anualmente cerca de 470 milhões de litros de leite. Esse valor que representou cerca de 6 % do total de leite produzido no estado (IBGE, 2017). Estima-se que 2,3 % desse montante de leite seja beneficiado na própria fazenda para a elaboração de queijos. O restante é destinado para indústrias laticínios (Minas Gerais, 2010).

O Campo das Vertentes possui uma tradição secular na produção de QMA. Acredita-se que o início dessa atividade coincidiu com a exploração mineradora da região, realizada durante a época colonial. Com o desenvolvimento de centros urbanos atrativos aos imigrantes, aumentou-se a demanda para produção de alimentos *in situ*. Um dos relatos históricos mais detalhados que fundamentam essa teoria foi feito pelo botânico e naturalista francês Augusto de Saint-Hilaire, no início do século XIX. Em sua obra, o autor faz menção a um queijo produzido na região de São João del-Rei, de coloração amarelada e sabor adocicado e agradável (Saint-Hilaire, 1937). Apesar de a atividade ser longeva, apenas em 2009 o Campo das Vertentes recebeu a identificação de região produtora de QMA (Minas Gerais, 2009).

Quadro 1: Microrregiões e municípios pertencentes à mesorregião do Campo das Vertentes-MG

Microrregião	Municípios legalmente considerados produtores de QMA	Demais municípios
São João del-Rei	Conceição da Barra de Minas Coronel Xavier Chaves Lagoa Dourada Madre de Deus de Minas Nazareno Piedade do Rio Grande Prados Resende Costa Ritópolis Santa Cruz de Minas São João del-Rei São Tiago Tiradentes	Dores de Campos          Santana do Garambéu
Barbacena	Barroso	Alfredo Vasconcelos Antônio Carlos Barbacena Capela Nova Caranaíba Carandaí Desterro do Melo Ibertioga Ressaquinha Santa Bárbara do Tugúrio Senhora dos Remédios
Lavras	Carrancas	Ijaci Ingá Itumirim Itutinga Lavras Luminárias Nepomuceno Ribeirão Vermelho

(IBGE, 2010; Minas Gerais, 2009)

Dos 36 municípios que compõem a região, 15 foram contemplados com o reconhecimento legal de região produtora de QMA, conforme pode ser observado na figura 2. Atualmente, a região do Campo das Vertentes possui cinco produtores registrados pelo IMA, situados nos municípios de Carrancas, Coronel Xavier Chaves (dois produtores), São João del-Rei e Tiradentes (Minas Gerais, 2022d).

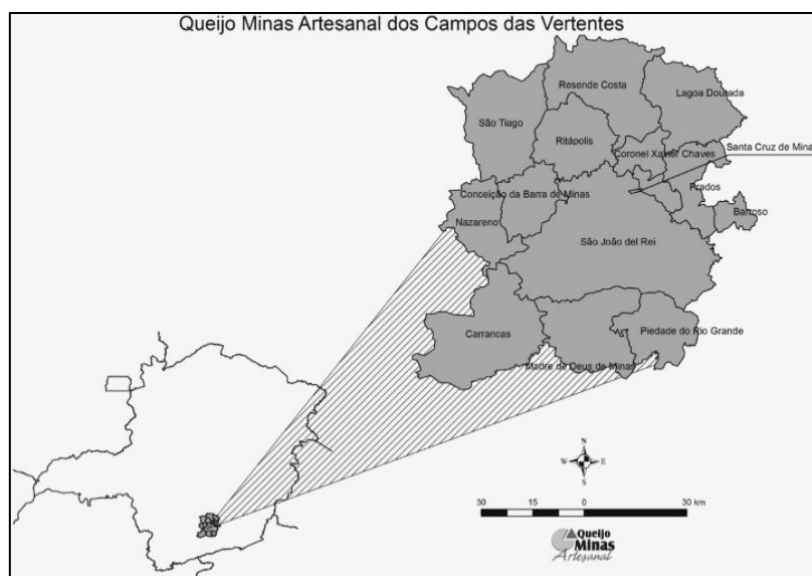


Figura 2. Localização geográfica dos municípios legalmente reconhecidos como produtores de queijo Minas artesanal na mesorregião de Campo das Vertentes-MG

Fonte: EMATER (2016)

### 3.2.3. Aspectos legais

#### 3.2.3.1. Regulamentação da produção e comercialização

O QMA, como todo produto alimentício, é regulamentado por um conjunto de legislações que podem ser de âmbitos municipal, estadual ou federal. Este conjunto de normas estabelecem diretrizes para sua produção, bem como para a comercialização destes alimentos. Dessa forma, a segurança desse produto é atestada, sobretudo, por meio da inspeção e fiscalização higiênico-sanitária de toda sua cadeia produtiva pelos órgãos competentes, que devem assegurar o cumprimento das exigências das legislações vigentes.

A primeira legislação específica para o QMA foi sancionada em 31 de janeiro de 2002 pelo governo do estado de Minas Gerais. A Lei nº 14.185 determinava padrões microbiológicos e físico-químicos na obtenção da matéria-prima e na qualidade da água das queijarias. Além disso, a adequação da infraestrutura da queijaria, dos currais e salas de ordenha, higienização de equipamentos e utensílios, vacinação dos animais e realização de exames no rebanho, além de higiene e saúde dos manipuladores foram pontos abordados pela lei (Minas Gerais, 2002b). Com a aprovação da Lei Estadual nº 19.492, em 13 de janeiro de 2011, foram alterados dispositivos da Lei Estadual nº 14.185, como a atribuição da responsabilidade ao poder público em promover o registro dos processos de produção do QMA (Minas Gerais, 2011).

Em 18 de dezembro de 2012 foi sancionada a Lei Estadual nº 20.549 que revogou a Lei Estadual nº 14.185 e dispôs sobre a produção e comercialização de queijos artesanais produzidos em Minas Gerais: o QMA, o queijo meia-cura, o queijo cabacinha e o requeijão artesanal (Minas Gerais, 2002b). Posteriormente, essa legislação também foi revogada pela Lei Estadual nº 23.157 em 18 de dezembro de 2018. A nova lei, além de ser mais abrangente no sentido de reconhecer a produção de outros tipos de queijos artesanais em Minas Gerais, buscou oficializar a produção artesanal de queijo como uma agroindústria de pequeno porte e instituiu programas de extensão rural e ações para valorização do queijo. O processo denominado de “afinação”, definido como

alterações que transformam as características do produto por meio da utilização de técnicas específicas, também passou a ser reconhecido oficialmente (Minas Gerais, 2018b).

No dia 12 de janeiro de 2018, o governo do estado de Minas Gerais sancionou a Lei nº 22.926 que dispôs sobre o Programa de Certificação de Produtos Agropecuários e Agroindustriais – Certifica Minas (Minas Gerais, 2018c). Baseado nisso, o IMA publicou a Portaria nº 1.859 em 31 de agosto do mesmo ano, no qual instituiu e regulamentou o programa “Certifica Minas”, voltado para a certificação de queijos artesanais do estado (Minas Gerais, 2018a). O programa objetivou a melhora dos processos de produção do QMA, abordando aspectos sanitários, gerenciais, sociais, econômicos, estruturais, geográficos e ambientais. Posteriormente, a Lei Estadual nº 23.157 de 18 de dezembro de 2018 oficializou a produção artesanal de queijo como uma agroindústria de pequeno porte e possibilita a criação de variedades diferentes de queijos artesanais em Minas Gerais. Com a sanção dessa Lei, revogou-se a Lei Estadual 20.549/2012, que também dispunha sobre a produção e comercialização dos queijos artesanais (Minas Gerais, 2018b). Em 2020, foi publicado o Decreto nº 48.024 que dispôs sobre a produção e a comercialização dos queijos artesanais de Minas Gerais (Minas Gerais, 2020b).

Em âmbito federal, foi sancionada a Lei 13.680, em 14 de junho de 2018, que dispõe sobre o processo de fiscalização de produtos alimentícios de origem animal produzidos de forma artesanal. Tal lei permite a comercialização interestadual de produtos alimentícios elaborados de forma artesanal, contendo selo único com a indicação “ARTE”, desde que submetidos à fiscalização de órgãos de saúde pública dos estados (Brasil, 2018). Em 2019 foi sancionada a Lei Federal nº 13.860 que dispôs sobre a elaboração e comercialização de queijos artesanais em todo território nacional (Brasil, 2019). O “Selo ARTE” na sua essência exercia a mesma finalidade do Sistema Brasileiro de Inspeção de Produtos de Origem Animal (SISBI-POA) em buscar a equivalência dos serviços de inspeção de estados e municípios.

Entretanto, o “Selo ARTE” inicialmente não foi claro na atribuição da responsabilidade da inspeção. A princípio, a fiscalização de tais produtos ficaria a cargo dos órgãos de saúde pública, não especificados na Lei 13.680 de 2018. Essa medida contrapunha o artigo 4º da Lei Federal nº 1.283 de 18 de dezembro de 1950, que estabeleceu a obrigatoriedade da fiscalização de produtos de origem animal e atribuiu a função ao Ministério da Agricultura e Secretarias Estaduais e Municipais (Brasil, 1950). Entretanto, com a publicação do Decreto nº 9.918 de 2020, que determinou que os órgãos de agricultura e pecuária eram responsáveis pela fiscalização dos produtos artesanais e concessão do “Selo ARTE” (Brasil, 2020).

### **3.2.3.2. Regulamentação do período de maturação**

O artigo 1º da Lei nº 1.283, de 18 de dezembro de 1950, estabeleceu a obrigatoriedade da inspeção de produtos de origem animal no Brasil (Brasil, 1950). O Regulamento da Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal (RIISPOA), publicado em 1952 pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), foi a primeira legislação a abordar a maturação de queijos produzidos a partir de leite cru no Brasil. Na ocasião, foi determinado que esse tipo de produto apenas poderia ser expedido após um período mínimo de dez dias após sua elaboração (Brasil, 1952).

Com a publicação da Portaria nº 146, de 07 de março de 1996, do MAPA (Brasil, 1996), ratificada posteriormente pela Resolução nº 07, de 28 de novembro de 2000 (Brasil, 2000), houve uma



alteração no período mínimo determinado para a maturação. Segundo essas normas, queijos produzidos a partir do leite cru deveriam ser submetidos à maturação, em temperatura superior a 5 °C, por um período mínimo de 60 dias. A mudança ocorreu em virtude da preocupação do órgão de inspeção em assegurar um período de maturação suficiente para a eliminação de possíveis perigos microbiológicos nesses produtos. Tal decisão causou grande insatisfação entre os produtores, visto que, após 60 dias de maturação são observadas alterações sensoriais em queijos, como endurecimento e ressecamento, que culminam na perda de identidade do produto e consequente baixa aceitação pelo mercado consumidor. Além disso, um período tão prolongado poderia inviabilizar o processo de maturação nas queijarias por questões relacionadas ao espaço físico para acondicionar os produtos por um longo período de tempo e ao menor giro de capital.

No âmbito do estado de Minas Gerais, diante da necessidade de regularizar o comércio do QMA, no dia 31 de janeiro de 2002 foi publicada a Lei Estadual nº 14.185 (Minas Gerais, 2002b), que dispunha sobre o processo de produção do queijo Minas artesanal. Além disso, a legislação em questão também estabelecia que a duração específica da maturação para cada região seria detalhada em futuras Portarias. Posteriormente, a Instrução Normativa nº 57/2011 do MAPA (Brasil, 2011) e, mais recentemente, o Decreto 9.013 em 2017 (Brasil, 2017), que revogou o Decreto 30.691/1952, estabeleceram que o período mínimo de maturação poderia ser modificado. Tal alteração é permitida mediante a realização de estudos científicos conclusivos que consigam comprovar a inocuidade do produto no período de maturação proposto ou em casos previstos em regulamentos técnicos de identidade e qualidade. Baseado nisso, o período mínimo de maturação do QMA foi definido por Portarias publicadas pelo IMA, que ao longo do tempo foram atualizadas fundamentando-se em estudos científicos realizados sobre a maturação do QMA. Como observado na tabela 2, o QMA produzido na região do Campo das Vertentes deve ser submetido a um período mínimo de maturação de 22 dias.

Tabela 2: Períodos mínimos de maturação para o queijo Minas Artesanal de cada região, estabelecidos por Portarias do Instituto Mineiro de Agropecuária

Portaria nº	Período mínimo de maturação (dias)						
	Araxá	Campo das Vertentes	Canastra	Cerrado	Serra do Salitre	Serro	Triângulo Mineiro
1.305/2013	22	22	22	22	-	17	-
1.736/2017	14	22	22	22	22	17	22
2.051/2021	14	22	14	22	14	17	22

Adaptado de: Minas Gerais (2013); Minas Gerais, (2017); Minas Gerais (2021)

Conforme observado na tabela 2, o período de maturação mínimo para o QMA produzido na mesorregião do Campo das Vertentes permaneceu inalterado ao longo dos anos. Esse perfil destaca a carência e a necessidade de realização de estudos para a determinação do período de maturação mais adequado para esse produto.

### 3.2.4. Influência do período de maturação sobre a qualidade de queijos artesanais

A maturação de queijos pode ser definida como um conjunto de complexos eventos microbiológicos e bioquímicos que resultam na lise de componentes químicos desse produto (como lactose, proteínas e lipídios) e contribuem para sua caracterização sensorial e sua inocuidade (Pagthinathan e Nafees, 2015).

Em geral, as mudanças na microbiota de queijos tendem a seguir um padrão ao longo da maturação: primeiramente, destaca-se a atividade de bactérias ácido-láticas (BAL) iniciadoras, envolvidas com o processo inicial de acidificação do produto (como, por exemplo, *Lactobacillus delbrueckii*, *Lactobacillus helveticus*, *Lactococcus* spp. e *Streptococcus thermophilus*); em seguida, há a predominância de uma microbiota secundária, formada por BAL não iniciadoras (*Enterococcus* spp., *Lactobacillus* spp., *Leuconostoc* spp. e *Pediococcus* spp.) (Montel *et al.*, 2014). A sucessão desses eventos é dependente de fatores como pH do meio, temperatura e umidade do ambiente de maturação, atividade da água, potencial de oxi-redução e presença de compostos inibidores (cloreto de sódio, nitrato e bacteriocinas, por exemplo) (Pagthinathan e Nafees, 2015).

Mudanças na diversidade da microbiota de QMA da Serra do Salitre-MG foram observadas no estudo de Sant'Anna *et al.* (2019). Bactérias das famílias Streptococcaceae e Planococcaceae se mostraram prevalentes nos queijos ao longo de toda maturação, enquanto que membros das famílias Lactobacillaceae e Leuconostocaceae se tornaram mais prevalentes apenas em estágios mais avançados desse processo. Os autores observaram que o estabelecimento da microbiota nesses queijos foi influenciado diretamente pela população microbiana presente nas matérias primas (leite cru e soro-fermento). Entretanto, as mudanças no perfil da comunidade microbiana se correlacionaram a fatores abióticos, como fatores geográficos e alterações de parâmetros físico-químicos ao longo da maturação (teor de umidade e acidez).

A maturação de queijos também contribui para a redução de indicadores microbiológicos de importância higiênica e sanitária. Em estudos sobre qualidade microbiológica de queijos, foi mostrado que micro-organismos como coliformes e *Staphylococcus* spp. apresentaram diminuições significativas em suas contagens ao longo da maturação (Sales, 2015; Taboada *et al.*, 2017; Figueiredo, 2018). A redução das contagens de micro-organismos indesejáveis nesses produtos pode estar relacionada principalmente ao metabolismo de BAL, que resulta na produção de compostos inibitórios como ácidos orgânicos (lático, principalmente) e bacteriocinas. Também contribuem para essa alteração de perfil as mudanças físico-químicas que ocorrem no queijo durante a maturação, como a redução de umidade e formação de diacetil, ácidos graxos livres e peptídeos a partir de reações bioquímicas como lipólise e proteólise (Ozturkoglu-Budak *et al.*, 2016; Taboada *et al.*, 2017; Khattab *et al.*, 2019).

Enzimas são consideradas as principais substâncias envolvidas nos processos bioquímicos que ocorrem nos queijos ao longo da maturação. Essas enzimas podem se originar de diferentes fontes: do leite (lipoproteína lipase), do agente coagulante (proteínases) e das bactérias fermentadoras (proteínases e esterases). O conjunto das reações enzimáticas pode ser dividido em três principais grupos: metabolismo de lactose, originando ácidos orgânicos; proteólise, levando a formação de peptídeos menores, aminoácidos livres e compostos orgânicos voláteis; e lipólise, originando ácidos graxos livres e compostos orgânicos voláteis (Khattab *et al.*, 2019).

O perfil físico-químico de queijos geralmente também apresenta um padrão definido de variação ao longo da maturação. A concentração dos componentes sólidos desses produtos (principalmente as proteínas e gordura) tende a aumentar com o avanço desse processo, como reflexo da perda de umidade que ocorre nos queijos. Apesar da ocorrência dos fenômenos de proteólise e lipólise, que resultam na degradação de proteínas e lipídeos, ambos os compostos tendem a aumentar a concentração ao longo da maturação devido à maior intensidade do efeito de concentração que ocorre em virtude da perda de umidade dos queijos. Por outro lado, o teor de lactose tende a diminuir em decorrência da fermentação microbiana. Como reflexo ao acúmulo de ácidos

orgânicos produzidos a partir do processo fermentativo, também é observada diminuição do pH e aumento da acidez (Oliveira, 2014; Ozturkoglu-Budak *et al.*, 2016; Taboada *et al.*, 2017).

As mudanças microbiológicas e físico-químicas que ocorrem nos queijos ao longo de maturação podem ser intensificadas de acordo com alguns fatores, sendo o principal deles as condições climáticas do ambiente.

### **3.2.5. Influência da época do ano sobre a qualidade de queijos artesanais**

Estudos têm demonstrado que a sazonalidade é um fator capaz de exercer efeitos sobre a qualidade de queijos elaborados a partir de leite cru (Addis *et al.*, 2015; Sánchez-Gamboa *et al.*, 2018). Parte do estado de Minas Gerais, que inclui a região do Campo das Vertentes, está localizada em uma região geográfica dotada de duas estações climáticas bem definidas ao longo do ano: uma caracterizada por alto índice pluviométrico e temperatura mais elevada, que se estende de outubro à março; e outra, de abril à setembro, marcada por um período de estiagem e temperaturas mais amenas (Nery e Machado, 2019).

Essas variações climáticas também repercutem nas características do QMA. Na época seca, o QMA tende a perder umidade com mais facilidade, o que resulta em um acentuado ressecamento (Costa Júnior *et al.*, 2014). Associado a isso, as baixas temperaturas observadas nesse período desfavorecem a viabilidade de micro-organismos indesejáveis nesses produtos. Por outro lado, a estação chuvosa apresenta um maior desafio do ponto de vista higiênico e sanitário aos queijos. Por ser exposto a um ambiente com umidade e temperatura mais elevadas, o QMA tende a apresentar aumento nas contagens de tais indicadores, o que pode comprometer sua qualidade e inocuidade (Castro *et al.*, 2016).

Além disso, a qualidade das matérias-primas utilizadas na produção do QMA também pode oscilar de acordo com a sazonalidade. A água, o leite cru e o soro-fermento tendem a apresentar maior contagem de micro-organismos no período chuvoso (Castro *et al.*, 2016). Propriedades físico-químicas do leite cru e, conseqüentemente, do soro-fermento, também variam diretamente de acordo com as mudanças climáticas. Na época das chuvas, os animais têm maior oferta de volumoso. Tal perfil nutricional resulta na produção de leite com teor de sólidos mais elevados, o que conseqüentemente aumenta o rendimento de produção de queijos. No inverno, embora as temperaturas mais amenas favoreçam que os animais consumam maior volume de matéria seca, a maior oferta de alimento nesse período são as dietas concentradas. Esse perfil nutricional influencia diretamente o volume de produção de queijos, uma vez que os concentrados resultam na diminuição do teor de sólidos no leite (Larsen *et al.*, 2010).

### **3.3. Qualidade microbiológica e físico-química da água**

O processamento de alimentos, principalmente envolvendo leite e derivados, é uma das atividades de maior consumo de água e formação de efluentes por unidade de produção. Por causa disso, a disponibilidade de água em qualidade e quantidade adequadas torna-se uma etapa fundamental para a produção de queijos (Boguniewicz-Zablocka *et al.*, 2019). Associado a isso, a qualidade da água utilizada na produção e manipulação de alimentos geralmente é um ponto negligenciado durante o processamento (Amaral *et al.*, 2003).

A partir do estudo de Pereira *et al.* (2014), foi possível caracterizar o perfil de captação e armazenamento de reservas hídricas nas queijarias da mesorregião do Campo das Vertentes. A água utilizada nessas queijarias é oriunda, principalmente, da captação de águas superficiais, como nascentes, riachos e rios. Das 32 queijarias avaliadas, apenas 25 % possuíam reservatório de água capaz de armazenar volume superior a 1000 litros, enquanto que aproximadamente 66 % armazenavam volumes de 501 a 1000 litros. O restante das queijarias tinha uma capacidade de armazenamento hídrico inferior a 500 litros, sendo que cerca de 13 % desses estabelecimentos trabalhavam com um volume de água menor que cinco litros por litro de leite processado. Essa quantidade, de acordo com os autores, é considerada insuficiente para atender a demanda hídrica de uma queijaria. Por fim, os autores também observaram que aproximadamente 56 % das queijarias não praticavam a cloração da água, o que poderia contribuir para a presença de micro-organismos indesejáveis na sua composição.

Ramírez-Castillo *et al.* (2015) demonstraram que micro-organismos potencialmente patogênicos, como *Escherichia coli*, *Salmonella enterica*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Campylobacter jejuni*, *Staphylococcus aureus* e *Listeria monocytogenes*, foram identificados a partir de amostras de água, justificando a importância da cloração para eliminação desses perigos. Por outro lado, micro-organismos potencialmente benéficos, como BAL, também já foram isolados de amostras de água provenientes de queijarias (Castro *et al.*, 2016).

A legislação do estado de Minas Gerais estabelece diretrizes para a qualidade da água utilizada nos processos produtivos do QMA. Segundo a Lei Estadual nº 14.185/2002, essa água deveria atender requisitos como a potabilidade; ser proveniente de nascentes livres de contaminação, de cisterna revestida ou de poço artesiano; ser canalizada da fonte até reservatório, e que esse seja tampado e feito de material sanitariamente adequado; e ser tratada por filtração e cloração (Minas Gerais, 2002b). Os padrões microbiológicos e físico-químicos de qualidade da água potável são definidos pela Portaria GM/MS nº 888 do Ministério da Saúde (Brasil, 2021) e pela Portaria nº 1.837 do IMA (Minas Gerais, 2018d), e estão descritos na tabela 3.

Tabela 3. Parâmetros microbiológicos e físico-químicos para água utilizada na produção de queijo Minas artesanal

Parâmetros	Critério de inspeção
<b>Microbiológicos</b>	
Coliformes a 30 °C (NMP/100 mL)	Ausência
Coliformes a 45 °C (NMP/100 mL)	Ausência
Contagem de mesófilos aeróbios (UFC/mL)	≤ 500
<b>Físico-químicos</b>	
Cloretos (mg/L)	≤ 250
Cloro residual (mg/L)	0,2 a 2,0
Dureza (mg/L)	≤ 500
pH	6,0 a 9,5

Adaptado de: Minas Gerais (2018d) e Brasil (2021)

Em estudos sobre a qualidade da água em queijarias da microrregião do Campo das Vertentes, foi observada a presença de bactérias do grupo coliforme. Esses resultados destacaram a relevância da via hídrica na inoculação de micro-organismos indesejáveis nos queijos (Oliveira, 2014; Pereira *et al.*, 2014; Castro *et al.*, 2016). Esses achados se associaram a falhas ou ausência do tratamento da água por cloração, que é um procedimento fundamental na redução desse perigo microbiológico.

### 3.4. Qualidade microbiológica e físico-química do soro-fermento

O pingo, como popularmente o soro-fermento endógeno é conhecido, é obtido a partir do soro de queijo liberado na produção de queijo no dia anterior. Após a enformagem e salga dos queijos, esses são mantidos sobre a bancada de produção. O soro liberado pela massa flui pela bancada até uma extremidade, onde é gotejado em um recipiente coletor. O soro-fermento é mantido nesse recipiente em temperatura ambiente até o processamento de queijos do dia seguinte, quando ele é adicionado à massa do queijo (Rafael, 2017).

Durante o período em que o soro-fermento é coletado e mantido em temperatura ambiente, ocorre a proliferação de micro-organismos presentes. Por causa disso, o soro-fermento é considerado um relevante fator na modelagem da microbiota do produto final. Um dos principais grupos microbianos relacionados a esse produto são as BAL, responsáveis pela propriedade fermentativa desempenhada por esse insumo (Kamimura *et al.*, 2020).

Por outro lado, o soro-fermento pode ser uma fonte de contaminação de micro-organismos indesejáveis. Estudos detectaram a presença de indicadores higiênico-sanitários no soro-fermento de queijarias da mesorregião do Campo das Vertentes, como *S. aureus* e coliformes (Oliveira, 2014; Castro *et al.*, 2016). Além disso, a presença de leveduras como *Candida intermedia*, *Kodamaea ohmeri*, *Debaryomyces hansenii*, *Torulapora delbrueckii* e *Kluyveromyces lactis* também é associada ao soro-fermento (Andrade *et al.*, 2017).

A qualidade do soro-fermento nas queijarias é medida com base na acidez titulável, uma vez que esse parâmetro é indicativo da atividade fermentativa de BAL. Embora não existam padrões estabelecidos para os parâmetros microbiológicos e físico-químicos desse insumo, na prática das queijarias o soro-fermento é considerado de qualidade adequada quando possui acidez variando de 75 a 100 °D. O desenvolvimento de acidez é um fator que auxilia na manutenção da qualidade microbiológica do soro-fermento. Alguns micro-organismos, principalmente os indesejáveis, são sensíveis a ambientes ácidos e podem não se manter viáveis em soros-fermentos com acidez apropriada (Rafael, 2017).

A presença do cloreto de sódio também exerce uma modulação na microbiota do soro-fermento, sendo nocivo principalmente para micro-organismos potencialmente patogênicos. Após a salga dos queijos, o cloreto de sódio se solubiliza na água e é carregado junto ao soro que se desprende da massa do queijo, resultando na presença dessa substância no soro-fermento (Rafael, 2017). Por outro lado, *Staphylococcus* spp. pode apresentar uma halotolerância que permite sua manutenção no soro-fermento (Elahi e Fujikawa, 2019).

### 3.5. Qualidade microbiológica e físico-química do leite cru

A qualidade do leite cru, considerado o principal insumo utilizado na produção de QMA, influencia diretamente os resultados de análises de parâmetros microbiológicos e físico-químicos do produto final. Além de ser fonte de nutrientes que irão compor os queijos (gordura, proteína, vitaminas e minerais), essa matéria-prima apresenta uma microbiota bastante diversificada. O perfil de micro-organismos e a contagem bacteriana total do leite cru são influenciados tanto pelas condições higiênicas nas quais ele é obtido e armazenado, bem como pela condição sanitária do rebanho (Tegegne e Tesfaye, 2017).

Em estudos sobre a qualidade do leite cru utilizado para produção de QMA da mesorregião do Campo das Vertentes, foi observada a presença de alguns micro-organismos indicadores higiênico-sanitários, como coliformes e *Staphylococcus aureus*. Por outro lado, também foram encontrados micro-organismos desejáveis e potencialmente benéficos, como as BAL (Oliveira, 2014; Castro *et al.*, 2016). Elas contribuem para a inocuidade dos queijos a partir da produção de compostos com propriedades inibitórias, como ácidos orgânicos e bacteriocinas, mencionados anteriormente. Além disso, essas bactérias participam efetivamente de processos bioquímicos ao longo da maturação, levando ao desenvolvimento das características sensoriais dos queijos (Khattab *et al.*, 2019). Entretanto, o leite cru também pode veicular micro-organismos indesejáveis, como aqueles relacionados à ocorrência de defeitos em queijos ou agentes etiológicos de doenças aos consumidores (Tilocca *et al.*, 2020).

Bactérias do grupo dos coliformes podem ser utilizadas como indicadores higiênico-sanitário da qualidade do leite cru. Composto pelos gêneros *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Escherichia*, *Erwenia*, *Klebsiella* e *Serratia*, os coliformes podem contaminar o leite cru a partir de fontes como água não tratada e superfícies/equipamentos mal higienizados, nos quais se acumulam sujidades e/ou material fecal. Além disso, animais com quadro de mastite ambiental, causada por coliformes, também podem os eliminar junto ao leite (Martin *et al.*, 2016). Os coliformes podem ser divididos entre os coliformes a 30 °C e a 45 °C. O primeiro diz respeito a micro-organismos presentes no ambiente. A identificação de coliformes a 30 °C no leite é indicativa das condições higiênicas nas quais esse produto foi obtido. A presença de coliformes a 45 °C, representados principalmente por *E. coli*, sugere a contaminação do leite cru por material fecal. Esse parâmetro é de grande importância sanitária, uma vez que algumas amostras de *E. coli* são potencialmente patogênicas (Wanjala *et al.*, 2018).

*S. aureus* também são considerados indicadores sanitários em leite cru, uma vez que eles podem estar relacionados à produção de enterotoxinas potencialmente capazes de causar surtos alimentares. Considerado um dos principais micro-organismos relacionados a infecções intramamárias em bovinos, o agente também pode estar presente em biofilmes aderidos às superfícies e na microbiota da pele e mucosas de humanos saudáveis, sendo uma fonte constante de contaminação aos alimentos (McMillan *et al.*, 2016).

Apesar de estudos não identificarem a presença de *Salmonella* spp. e *Listeria* spp. em leite cru destinado à produção de QMA do Campo das Vertentes (Oliveira, 2014; Castro *et al.*, 2016), este produto pode ser um potencial veiculador desses patógenos (Nagoette *et al.*, 2019).

A qualidade físico-química do leite cru também é um ponto importante a ser abordado, uma vez que a qualidade e rendimento na produção dos queijos estão diretamente relacionados a esse fator. O teor de sólidos do leite, representado principalmente por gordura e proteína, pode oscilar por uma série de fatores, como aqueles relacionados à genética dos animais (individualidade e raça), ao ambiente (temperatura e nutrição), ao estado fisiológico (idade, estágio e ordem da lactação, duração do período seco e idade ao primeiro parto) e à saúde do úbere (contagem de células somáticas) (Tančin *et al.*, 2018).

A contagem de células somáticas (CCS) do leite pode ser considerada um parâmetro indicativo da saúde do rebanho. Essas células incluem os leucócitos (75-85 %), que atuam na defesa imunológica do úbere, e células epiteliais (15-25 %), que naturalmente se descamam do epitélio glandular. O leite obtido de um animal saudável apresenta concentrações menores que 10<sup>5</sup> células/mL. Entretanto, com o estabelecimento de uma infecção e desenvolvimento de uma

resposta inflamatória na glândula mamária, são observados tanto o aumento do recrutamento de células de defesa como o aumento da taxa de descamação celular do epitélio, culminando na elevação da CCS (Malik *et al.*, 2018).

O processo inflamatório da glândula mamária influencia diretamente a qualidade do leite e a produção de derivados lácteos a partir dele, como os queijos. A mastite, além de diminuir o volume de leite produzido, promove uma redução do teor de sólidos do leite e uma inversão da relação percentual entre proteínas do soro e caseínas. Esse perfil resulta em perdas de rendimento. Defeitos sensoriais em virtude do aumento da CCS no leite também podem ser observados nos queijos, como o desenvolvimento de sabores rançosos ou amargos, que se relacionam à ação de enzimas, lipases e proteases, respectivamente, que são ativadas pelos leucócitos (Bobbo *et al.*, 2017).

Portanto, percebe-se que a qualidade do leite cru influencia diretamente a qualidade de queijos. Os padrões microbiológicos e físico-químicos do leite cru destinado à produção de QMA são estabelecidos pelo Decreto nº 42.645 de 2002, conforme pode ser observado na tabela 4 (Minas Gerais, 2002c).

Tabela 4. Parâmetros microbiológicos e físico-químicos para o leite cru utilizado na produção de queijo Minas artesanal

Parâmetros	Critério de inspeção
<b>Microbiológicos</b>	
Contagem padrão em placas (UFC/mL)	1 x 10 <sup>5</sup>
Contagem de células somáticas (células/mL)	4 x 10 <sup>5</sup>
<i>Staphylococcus aureus</i> (UFC/mL)	1 x 10 <sup>2</sup>
<i>Escherichia coli</i> (UFC/mL)	1 x 10 <sup>2</sup>
<i>Salmonella</i> spp. (presença/25g)	Ausência
<b>Físico-químicos</b>	
Gordura (g/100g)	≥ 3,0
Acidez titulável (°D)	15 - 20
Lactose (g/100g)	≥ 4,3
Extrato seco desengordurado (g/100g)	≥ 8,5
Extrato seco total (g/100g)	≥ 11,5
Resíduos de antimicrobianos	Ausência

Adaptado de: Minas Gerais (2002c)

### 3.6. Biofilmes relacionados à produção de queijos

Biofilmes são comunidades microbianas diversificadas e complexas, que podem ser definidos como um ecossistema de funcionamento independente e regulado homeostaticamente, formado por uma ou mais espécies de micro-organismos, que permanecem imersos em matriz extracelular orgânica fixada a superfícies bióticas ou abióticas (Percival *et al.*, 2011; Galié *et al.*, 2018). Biofilmes são considerados um dos modos de vida mais amplamente distribuídos e bem-sucedidos da natureza. A diversidade de micro-organismos pode ser elevada e sua quantidade em biofilmes pode atingir valores de 10<sup>8</sup> a 10<sup>11</sup> células por grama de massa úmida (Flemming *et al.*, 2016).

O desenvolvimento de biofilmes em superfícies é dependente de fatores como as características do material de superfície, a capacidade das bactérias se aderirem e as condições ambientais (Srey *et al.*, 2013). Em ambientes de processamento de queijos, o estabelecimento desse ecossistema está diretamente relacionado a inadequações dos processos de limpeza e desinfecção das

superfícies que o produto tem contato, como utensílios, tanque de coagulação, bancada de produção e prateleiras de maturação. Isso permite que micro-organismos se desenvolvam e permaneçam regularmente no ambiente, atuando como uma fonte de contaminação constante aos produtos. Cabe ressaltar que fatores relativos aos queijos podem também contribuir para a presença de biofilmes em queijarias, como sua alta carga microbiana e diversidade microbiológica. Queijos mais frescos tendem a apresentar maior teor de umidade, maior atividade de água e maior superfície de contato. Tais propriedades favorecem a interação entre a matriz alimentar e os biofilmes (Ismail *et al.*, 2017).

Os principais micro-organismos relacionados à formação de biofilmes são bactérias e fungos. Em trabalhos realizados em queijarias artesanais foi demonstrada a persistência e dominância de BAL em queijo, sendo essas oriundas de biofilmes presentes em utensílios e equipamentos utilizados durante a etapa de elaboração. As principais BAL encontradas em tanques de madeira usados para produção de queijo *Rugasano* na Itália foram *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus* spp., *Lactococcus* spp., *Enterococcus* spp. e *Leuconostoc* spp., com contagens variando de aproximadamente  $10^2$  a  $10^5$  UFC/cm<sup>2</sup> (Carpino *et al.*, 2017).

No estudo de Castro *et al.* (2016) é mostrado que, embora o leite cru, o soro-fermento e a água usada em queijarias não contenham número expressivo de BAL, esse grupo microbiano apresentou altas contagens no QMA da mesorregião do Campo das Vertentes no início do período de maturação. Esses resultados sugerem que, provavelmente, biofilmes de BAL presentes no ambiente de queijarias podem contribuir significativamente para a inoculação desses micro-organismos no produto.

Por outro lado, é notória a preocupação da comunidade científica e órgãos de saúde acerca da presença de biofilmes de micro-organismos patogênicos nesses ambientes. Essa afirmação é baseada no elevado número de estudos publicados sobre biofilmes contendo micro-organismos potencialmente patogênicos como, coliformes, *S. aureus* e *L. monocytogenes* (Ismail *et al.*, 2017; Silva *et al.*, 2017; Campos *et al.*, 2018). Apesar da importância dos biofilmes, ainda são escassos os estudos que abordam a pesquisa de micro-organismos em superfícies relacionadas à elaboração de QMA.

No estudo de Galinari *et al.* (2014), realizado em queijarias produtoras de QMA da Serra da Canastra e do Serro, foi feita a contagem microbiana em superfícies de utensílios de madeira envolvidos com o processo de elaboração dos queijos, como bancadas de produção, formas e prateleiras de maturação. As contagens dos micro-organismos pesquisados podem ser verificadas na tabela 5.

Esses resultados destacaram a diversidade populacional que pode estar presente em superfícies de contato com QMA, incluindo micro-organismos potencialmente patogênicos, indicadores higiênicos e potenciais deteriorantes de queijos. Embora os resultados das contagens de *Staphylococcus* spp. e coliformes apresentassem valores acima do que foi classificado como ideal pelos autores (conforme pode ser observado na tabela 6), as BAL se mostraram o grupo microbiano predominante nessas superfícies.



Tabela 5. Média e coeficiente de variação das contagens de micro-organismos presentes nas superfícies de utensílios de madeira utilizados para produção de queijo Minas artesanal

Micro-organismo	Região	Contagem (log UFC/cm <sup>2</sup> )		
		Forma	Bancada	Prateleira
Mesófilos aeróbicos	Serro	2,52 ± 1,44	4,29 ± 1,31	4,69 ± 1,38
	Canastra	-	4,58 ± 1,46	4,56 ± 0,34
Leveduras	Serro	1,03 ± 1,39	2,98 ± 0,23	3,21 ± 0,39
	Canastra	-	3,27 ± 0,21	3,25 ± 0,65
BAL - MRS	Serro	2,59 ± 1,20	4,01 ± 0,52	3,99 ± 0,42
	Canastra	-	4,26 ± 1,01	4,35 ± 0,57
BAL - M17	Serro	2,27 ± 1,71	4,58 ± 0,69	4,68 ± 1,07
	Canastra	-	4,39 ± 1,14	4,53 ± 0,35
<i>Staphylococcus</i> spp.	Serro	0,38 ± 0,66	0,15 ± 0,15	0,16 ± 0,28
	Canastra	-	0,73 ± 0,68	0,85 ± 0,73
Coliformes a 30 °C	Serro	0 ± 0	0,33 ± 0,30	0,66 ± 1,14
	Canastra	-	2,23 ± 1,23	1,17 ± 0,12
Coliformes a 45 °C	Serro	0 ± 0	0,07 ± 0,12	0,27 ± 0,47
	Canastra	-	0,74 ± 1,29	0,47 ± 0,45

Adaptado de: Galinari *et al.* (2014)

Embora não existam padrões legalmente estabelecidos para contagem de micro-organismos em superfícies de estruturas e utensílios de queijarias, alguns valores limites para a contagem microbiana em superfícies relacionadas ao processamento de alimentos são propostos por estudos científicos e por órgãos de saúde, conforme pode ser observado na tabela 6.

Tabela 6. Padrões sugeridos para concentração microbiana em superfícies relacionadas ao processamento de alimentos

Micro-organismos	Limite máximo (log UFC/cm <sup>2</sup> )
Mesófilos aeróbicos	2,0
<i>Staphylococcus aureus</i>	0,7
Coliformes a 30 °C	1,4
Coliformes a 45 °C	0,7

Adaptado de: Sveum *et al.* (1992) e Galinari *et al.* (2014)

### 3.7. Qualidade microbiológica do queijo Minas artesanal (QMA)

A composição da microbiota do QMA é diretamente influenciada por fatores como: qualidade dos insumos, adequação do processo às boas práticas de elaboração e tipos de micro-organismos presentes nas superfícies de contato. Por causa da grande variedade de micro-organismos que podem estar presentes nos queijos, estes podem ser divididos em dois grupos: os micro-organismos desejáveis e os indesejáveis (Galinari *et al.*, 2014; Castro *et al.*, 2016).

Queijos elaborados com leite cru possuem características sensoriais peculiares, relacionadas ao sabor, ao aroma e à textura. Tais características se devem, principalmente, a atividade de micro-organismos presentes em sua composição, como as BAL e leveduras. Além de serem fundamentais para o desenvolvimento das propriedades sensoriais dos queijos, esses micro-organismos também contribuem para a inocuidade do produto. Por meio de processos metabólicos, esses micro-organismos sintetizam compostos de caráter inibitório que auxiliam na

redução de alguns perigos microbiológicos que os queijos fabricados com leite cru podem apresentar (Yoon *et al.*, 2016).

A presença de perigos microbiológicos nesses queijos se relaciona, principalmente, à ausência de tratamentos térmicos aplicados ao leite cru. A aplicação de um tratamento térmico, como a pasteurização, é capaz de eliminar totalmente eventuais micro-organismos patogênicos que possam estar presentes no leite cru, como *Brucella abortus*, patótipos de *E. coli*, *L. monocytogenes*, *Mycobacterium bovis*, *Salmonella* spp. e *S. aureus* (Brooks *et al.*, 2012).

Embora não existam notificações de surtos alimentares envolvendo o consumo de QMA, queijos elaborados com leite cru ocasionaram ocorrências dessa natureza. Costard *et al.* (2017) observaram que nos Estados Unidos da América, o consumo de queijos produzidos com leite não pasteurizado foi associado a cerca de 96 % dos surtos alimentares envolvendo o consumo de derivados lácteos. Além disso, os autores determinaram que o consumo de produtos lácteos não pasteurizados era capaz de causar 840 vezes mais morbidades e 45 vezes mais hospitalizações que o consumo de produtos pasteurizados.

Alguns micro-organismos podem também estar relacionados à ocorrência de alterações depreciativas na aparência ou no sabor dos queijos, como nos defeitos de estufamento precoce (causado por coliformes), estufamento tardio (causado por algumas espécies não patogênicas de *Clostridium*) e desenvolvimento de sabores amargos e manchas (causadas por leveduras e *Pseudomonas* spp.) (Sobral *et al.*, 2017).

Para o controle da qualidade higiênica-sanitária do QMA, padrões microbiológicos foram estabelecidos pelo Decreto Estadual nº 42.645/2002 e alterados pelo Decreto Estadual nº 44.864/2008, conforme pode ser observado na tabela 7 (Minas Gerais, 2008).

Tabela 7. Padrões microbiológicos para inspeção sanitária de queijo Minas artesanal

Indicador	Tolerância para amostra representativa			
	n	c	m	M
Coliformes a 30 °C/g	5	2	1 x 10 <sup>3</sup>	5 x 10 <sup>3</sup>
Coliformes a 45 °C/g	5	2	1 x 10 <sup>2</sup>	5 x 10 <sup>2</sup>
<i>Staphylococcus</i> coagulase positivo/g	5	2	1 x 10 <sup>2</sup>	1 x 10 <sup>3</sup>
<i>Salmonella</i> spp./25g	5	0	0	-
<i>Listeria</i> spp./25g	5	0	0	-

Adaptado de: Minas Gerais (2008)

Além disso, o IMA estabelece, por meio da Portaria nº 1.937/2019, que as propriedades produtoras de QMA devem ser certificadas como livres de tuberculose e brucelose, evitando dessa forma que patógenos causadores dessas doenças possam ser veiculados aos queijos a partir do leite cru oriundo de animais infectados (Minas Gerais, 2019).

### 3.7.1. Bactérias ácido-láticas

BAL é um grupo microbiano que apresenta similaridades fisiológicas e morfológicas. Elas são encontradas nas formas de bastonetes ou cocos que se coram como Gram positivo, são imóveis, não esporuladas e catalase-negativo. A fermentação de carboidratos resultando na formação de ácidos orgânicos é a principal característica metabólica dessas bactérias (Wassie e Wassie, 2016).

O grupo é composto por 13 gêneros bacterianos pertencentes ao filo Firmicutes, com um maior destaque para *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Enterococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus* e *Weissella*. Esses micro-organismos são componentes da microbiota de mucosas de animais, como as mucosas dos tratos urogenital inferior, respiratório superior e gastrointestinal. Além disso, eles estão amplamente difundidos e adaptados ao ambiente, podendo ser isolados do solo, da água, de plantas e de alimentos com alto teor nutritivo, como leite e derivados, carnes e produtos cárneos, pescado e grãos (Landete, 2017).

Devido à capacidade de fermentação e por serem geralmente consideradas seguras e benéficas, BAL são amplamente utilizadas na produção de alimentos fermentados e participam efetivamente do processo de maturação de queijos. Além de produzirem ácidos orgânicos, principalmente o ácido lático, também é atribuído às BAL o desenvolvimento de sabores característicos devido à atividade de suas enzimas sobre a matriz láctea (Blaya *et al.*, 2018).

A acidificação promovida por BAL durante a maturação dos queijos também é um fator que contribui para a inocuidade do produto, uma vez que a acidificação do meio o torna impróprio para a sobrevivência de diversos outros micro-organismos. BAL ainda podem produzir outros compostos de caráter antagonista além dos ácidos orgânicos, como bacteriocinas, peróxido de hidrogênio, diacetil e acetaldeído (Morandi *et al.*, 2019).

Algumas amostras de BAL isoladas a partir de queijos artesanais apresentaram potencial probiótico. No trabalho de Sant'Anna *et al.* (2017), BAL isoladas de QMA do Campo das Vertentes demonstraram capacidade de inibir, *in vitro* e *in vivo*, a atividade de micro-organismos patogênicos, como *Shigella flexneri*, *E. coli*, *L. monocytogenes*, *Salmonella enterica* var. Typhimurium e *S. aureus*.

Em QMA, foi observado que as contagens de BAL podem variar de  $2,2 \times 10^6$  a  $8,3 \times 10^9$  UFC/g, de acordo com a região em que foi produzido, época do ano e período de maturação (Oliveira, 2014; Sales, 2015; Castro *et al.*, 2016; Figueiredo, 2018).

### 3.7.2. Bolores e leveduras

Bolores e leveduras podem ser introduzidos à microbiota dos queijos a partir de fontes como o fermento, o ar, a água, os equipamentos, a manipulação e o processo de salga. Da mesma forma que as bactérias, alguns fungos podem exercer efeitos benéficos ao queijo, enquanto outros são considerados indesejáveis (Banjara *et al.*, 2015).

Alguns bolores e leveduras contribuem com o desenvolvimento de sabor, textura e aparência nos queijos. Em queijos Camembert, Brie e Cambozola, bolores como *Penicillium camembertii* produzem compostos voláteis a partir do metabolismo de proteínas, gordura e carboidratos. Tais metabólitos resultam na formação das características sensoriais próprias desses queijos (Suzuki-Iwashima *et al.*, 2020). Da mesma forma, no processo de produção de queijos azuis Roquefort e Gorgonzola são utilizados bolores do complexo *P. roqueforti* como agentes de maturação, com o objetivo de promover reações desejáveis de proteólise e lipólise (García-Estrada e Martín, 2016). Em queijarias especializadas na produção de queijos mofados, os produtos são maturados em cavernas subterrâneas que permitem a formação de um microclima favorável ao crescimento desses micro-organismos (Souza *et al.*, 2021).

No estudo de Borelli *et al.* (2006), foram identificadas 176 amostras de leveduras em QMA da Serra da Canastra, sendo *Debaryomyces hansenii*, *Kluyveromyces lactis*, *Kodamaea ohmeri* e *Torulaspora delbrueckii* as mais frequentes. Desse total, 8,5 % eram capazes de produzir proteases, 2,3 % lipases e 21,6 %  $\beta$ -galactosidase. Conforme abordado, essas enzimas contribuem para o desenvolvimento de sabor e odor no produto durante a maturação. Corroborando com esses resultados, Lima *et al.* (2009) e Cardoso *et al.* (2015) também identificaram *D. hansenii* e *K. lactis* em QMA produzidos, respectivamente, na Serra do Salitre e no Serro.

Se por um lado o crescimento de fungos filamentosos faz parte do processo de produção de alguns queijos, em outros casos essa ocorrência pode causar uma depreciação visual do produto (Sobral *et al.*, 2017). Além disso, alguns bolores e leveduras têm grande relevância em relação à saúde pública por serem potencialmente patogênicos ou produtores de micotoxinas. Leveduras do gênero *Candida* são consideradas um dos principais micro-organismos oportunistas que estão relacionados à microbiota de queijos artesanais. Wanderley *et al.* (2013) identificaram 251 amostras de *Candida* spp. em queijos artesanais. Em estudos sobre o QMA foi detectada a presença de *C. intermedia* em produtos oriundos do Serro (Cardoso *et al.*, 2015) e da Canastra (Andrade *et al.*, 2017).

Pesquisas em queijos artesanais detectaram a presença de algumas micotoxinas, como citrinina (nefrotóxica), penitrem A (neurotoxina), roquefortina C (neurotoxina), esterigmatocistina (composto carcinogênico e mutagênico), aflatoxina (hepatotóxica) e ocratoxina (composto carcinogênico e nefrotóxico). Tais substâncias são produzidas a partir do metabolismo secundário de fungos, principalmente, dos gêneros *Penicillium* e *Aspergillus* (Anelli *et al.*, 2019).

De acordo com estudos, a contagem de bolores e leveduras no QMA pode variar de  $< 1,0 \times 10^3$  a  $2,1 \times 10^7$  UFC/g (Oliveira, 2014; Sales, 2015; Castro *et al.*, 2016; Figueiredo, 2018).

### 3.7.3. Coliformes a 30 °C e 45 °C

Coliformes é uma classificação não taxonômica de bactérias que possuem algumas similaridades morfológicas e fisiológicas. Elas são bastonetes anaeróbios facultativos, que se coram como Gram negativo e que são capazes de fermentar lactose. Esses micro-organismos podem ser divididos, didaticamente, em três grupos: coliformes ambientais psicrotolerantes (compostos pelos gêneros *Serratia*, *Hafnia*, *Rahnella*, *Buttiauxella* e *Leclercia*), coliformes fecais termotolerantes (compostos unicamente por *E. coli*) e coliformes ubíquos (compostos pelos gêneros *Enterobacter*, *Citrobacter* e *Klebsiella*) (Trmčić *et al.*, 2016).

A presença de coliformes em alimentos é considerada um sinalizador das condições higiênicas no qual esse alimento foi produzido e/ou um reflexo da qualidade das matérias-primas utilizadas para sua elaboração. Nesse sentido, a presença de coliformes a 30 °C em queijos é um importante indicador higiênico, uma vez que essa pesquisa engloba todos os micro-organismos do grupo. Isso sugere que o produto ou suas matérias-primas possam ter tido contato, direto ou indireto, com fontes como partículas oriundas do solo, água contaminada e fezes de animais de sangue quente. Os manipuladores e a presença de insetos também se apresentam como potenciais fontes de inoculação de coliformes a 30 °C em queijos (Martin *et al.*, 2016).

Coliformes a 45 °C representam uma parcela dos coliformes a 30 °C, composta principalmente por *E. coli*. Dessa forma, a presença de coliformes a 45 °C em queijos pode refletir o contato

desse produto com partículas fecais. Além de ser considerado um indicador higiênico, esse parâmetro também tem grande importância do ponto de vista sanitário, uma vez que algumas amostras de *E. coli* possuem um potencial patogênico (Silva *et al.*, 2020). De acordo com a virulência e mecanismos de patogenicidade, *E. coli* patogênicas podem ser divididas em sete diferentes patotipos: *E. coli* enterohemorrágica (EHEC), *E. coli* produtora de toxina Shiga (STEC), *E. coli* enteropatogênica (EPEC), *E. coli* enterotoxigênica (ETEC), *E. coli* enteroagregativa (EAEC), *E. coli* de adesão difusa (DAEC) e *E. coli* enteroinvasora (EIEC) (Jang *et al.*, 2017). Além disso, a indicação da presença de material fecal nos queijos pode se refletir em riscos sanitários em decorrência da presença de outros micro-organismo patogênicos, além de *E. coli*, de origem fecal (Silva *et al.*, 2020).

Nesse sentido, Currie *et al.* (2018) descreveram um surto envolvendo o consumo de queijos *Gouda* contaminados com EHEC do sorotipo O157:H7 no Canadá. Dos 29 indivíduos acometidos, cinco foram hospitalizados e um progrediu para óbito. Da mesma forma, o consumo dos queijos franceses *Saint-Marcellin* e *Saint-Félicien* foi relacionado à ocorrência de 13 casos de síndrome hemolítica-urêmica pediátrica provocada por STEC (Jones *et al.*, 2019).

Além dos coliformes terem grande implicação em questões higiênico-sanitárias envolvendo a produção de queijos, esses micro-organismos também se associam a ocorrência de defeitos nesses produtos. O estufamento precoce é um fenômeno que pode ocorrer em queijos que apresentem uma contagem inicial de coliformes de partir de  $10^2$  UFC/g. O defeito recebe o título de “estufamento” devido à formação de gases como dióxido de carbono e gás hidrogênio resultante do metabolismo heterofermentativo desses micro-organismos. A produção e acúmulo de gases no interior dos queijos levam a um aumento do volume do queijo e a formação de diversas olhaduras pequenas e regulares na massa. O fenômeno é conhecido popularmente como “queijo rendado”. A denominação de “precoce”, por sua vez, se relaciona à celeridade do processo de desenvolvimento do defeito. A alteração visível pode ser manifestar ainda na primeira semana de maturação dos queijos e, em alguns casos, em até poucas horas após a produção. Além disso, os produtos da descarboxilação de aminoácidos exercida por coliformes também são capazes de alterar negativamente características sensoriais dos queijos, como sabor e aroma (Sobral *et al.*, 2017; Tabla *et al.*, 2018).

Estudos apontam que a contagem de coliformes a 30 °C em QMA pode variar de  $< 1,0 \times 10^1$  a  $> 1,1 \times 10^4$  NMP/g. Em relação aos coliformes a 45 °C, essas contagens podem oscilar de  $< 3,0$  a  $> 1,1 \times 10^4$  NMP/g em QMA. Em geral, os coliformes tendem a apresentar contagens mais elevadas no período chuvoso. Entretanto, essas contagens tendem a diminuir ao longo da maturação (Oliveira, 2014; Sales, 2015; Castro *et al.*, 2016; Figueiredo, 2018).

#### **3.7.4. *Staphylococcus* spp.**

*Staphylococcus* spp. são cocos anaeróbios facultativos e que se coram como Gram positivo. Dada à ubiquidade desse gênero bacteriano, o ambiente pode se apresentar como uma fonte de contaminação. Entretanto, a presença dessas bactérias no queijo geralmente está relacionada à veiculação pelo leite, uma vez que *Staphylococcus* spp. é um dos principais micro-organismos envolvidos em infecções intramamárias. Animais acometidos com mastite causada por *Staphylococcus* spp. podem eliminar esses micro-organismos junto no leite. Além disso, a manipulação do queijo por indivíduos portadores também se associa à inoculação de *Staphylococcus* spp. no produto (Castro *et al.*, 2016; Kümmel *et al.*, 2016).

A presença de *Staphylococcus* spp. em queijos é de grande importância para saúde pública, devido à potencial capacidade de causar surtos de intoxicação alimentar. Essas bactérias podem produzir cerca de 23 diferentes tipos de enterotoxinas, sendo essas resistentes às mudanças de temperatura e de pH e à atividade de enzimas proteolíticas. Dessa forma, uma vez que os *Staphylococcus* spp. tenham produzido esses compostos em uma matriz, mesmo que os micro-organismos sejam eliminados, o perigo relacionado às enterotoxinas persiste (Zeleny *et al.*, 2016).

A intoxicação alimentar causada pela ingestão de enterotoxina estafilocócica leva uma gastroenterite aguda. Em alguns casos, poucas horas após o consumo de queijos contaminados ocorre o desenvolvimento de sinais clínicos como dores abdominais, náuseas e diarreia (Finazzi *et al.*, 2018). De acordo com o relato de surto descrito por Jöhler *et al.* (2015), o consumo de queijo elaborado com leite cru contendo toxina estafilocócica provocou intoxicação em 14 indivíduos na Suíça. A pesquisa por enterotoxinas determinou que o queijo envolvido com o surto apresentava uma concentração de aproximadamente 200 ng/g desse composto. Intoxicação alimentar envolvendo o consumo de QMA contendo enterotoxinas estafilocócicas foi descrita por Carmo *et al.* (2002). No surto em questão, 50 indivíduos expostos a queijo Minas produzido em Passa Quatro-MG, apresentaram a sintomatologia clássica duas horas após o consumo.

Em pesquisa de genes relacionados à produção de enterotoxinas em amostras de *S. aureus* isoladas de QMA da mesorregião do Campo das Vertentes, 18,42 %, 18,42 %, 2,63 %, e 77,63 % dos 76 micro-organismos isolados foram positivas para, respectivamente, os genes *sea*, *tsst-1*, *sec* e *agr*. Esse resultado destacou o potencial perigo da presença de *S. aureus* capazes de produzir toxina para a segurança do QMA produzido na região do Campo das Vertentes (Castro *et al.*; 2020).

Conforme abordado anteriormente, a legislação determina a pesquisa de *Staphylococcus* coagulase positivo para controle da qualidade sanitária de QMA. Esse grupo inclui nove espécies: *S. aureus*, *S. intermedius*, *S. pseudintermedius*, *S. delphini*, *S. hyicus*, *S. schleiferi*, *S. lutrae*, *S. agnetis* e *S. cornubiensis*. *Staphylococcus* coagulase positivo são usualmente considerados micro-organismos patogênicos, devido à correlação entre a capacidade de produzir enzimas coagulantes do plasma com a presença de fatores de virulência, incluindo leucocidinas, hemolisinas, adesinas e toxinas (González-Martín *et al.*, 2020).

Castro *et al.* (2020) e Allaion *et al.* (2022) identificaram a presença de genes produtores de enterotoxinas em *Staphylococcus* coagulase positivo isolados de QMA. Entretanto, estudos demonstraram que *Staphylococcus* coagulase negativo também podem portar tais genes (Andrade *et al.*, 2019; Nascimento *et al.*, 2020). Portanto, a ausência de amostras positivas no teste de coagulase não elimina o perigo da produção de enterotoxinas por *Staphylococcus* spp. em queijos. Tais achados sugerem que a pesquisa de enterotoxinas seja o parâmetro mais adequado para a fiscalização higiênico-sanitária de alimentos.

As contagens de *Staphylococcus* spp. podem variar de  $4,1 \times 10^4$  a  $1,1 \times 10^8$  UFC/g em QMA. *Staphylococcus* coagulase positivo apresentaram contagens de  $< 9,0$  a  $7,2 \times 10^7$  UFC/g (Oliveira, 2014; Sales, 2015; Castro *et al.*, 2016; Figueiredo, 2018). Nos estudos citados foi observada a tendência de *Staphylococcus* spp. manter as contagens durante a maturação, enquanto as contagens de *Staphylococcus* coagulase negativo diminuem com avanço da maturação.

### 3.7.5. *Salmonella* spp.

*Salmonella* spp. são bastonetes flagelados e anaeróbios facultativos, que se coram como Gram negativo. Essa bactéria é considerada um dos principais perigos sanitários associados ao consumo de leite cru e seus derivados. Por esse motivo, legislações visando o controle sanitário de produtos lácteos estabelecem que esses devem ser ausentes de *Salmonella* spp.. Naturalmente, essa bactéria é encontrada na microbiota intestinal de animais; portanto, sua presença em alimentos também é indicativa de contaminação fecal (Lobacz *et al.*, 2020).

As salmoneloses são doenças causadas por diversos sorotipos de *S. enterica* e, geralmente, se caracterizam por uma síndrome de gastroenterite autolimitada. De acordo com o sorotipo de *S. enterica* envolvida, esses quadros podem ser classificados em febre tifoide, febre paratifoide e salmonelose não tifoide (El-Ghany, 2020). Entre essas enfermidades, a febre tifoide causada por *S. enterica* subsp. *enterica* sorotipo Typhi promove um quadro gastrointestinal e sistêmico mais grave. A presença desse sorotipo em alimentos se associa ao contato dessa matriz com material fecal humano, uma vez que essa espécie é o único reservatório de *S. Typhi*. Estima-se que as salmoneloses causem cerca de 17 milhões de casos anualmente no mundo, sendo que 180 mil desses progridem para óbito (Radhakrishnan *et al.*, 2018).

Surtos de salmonelose envolvendo o consumo de queijos artesanais têm sido relatados por alguns estudos. Na França, investigações epidemiológicas apontaram os queijos *Morbier* e *Vacherin Mont d'Or* como veículos de *S. Dublin* durante um surto entre os anos de 2015 e 2016 (Ung *et al.*, 2019). Seis diferentes sorotipos de *Salmonella* spp. foram detectados em queijos *Kareish*, produzidos no Egito em 2015, sendo eles *S. Enteritidis*, *S. Typhimurium*, *S. Heidelberg*, *S. Infantis*, *S. Tsevie* e *S. Haifa* (El-Baz *et al.*, 2017).

Em QMA produzido na região do Serro, *Salmonella* spp. foi detectada em um produto nos primeiros 15 dias de maturação. Todavia, após 22 dias de maturação esse patógeno não foi mais encontrado (Martins *et al.*, 2015). O patógeno também foi identificado em um QMA com 22 dias de maturação, oriundo de queijaria localizada na região de Araxá (Sales, 2015). Esse resultado se destaca pelo fato de envolver um queijo que havia sido submetido a um período de maturação considerado suficiente, de acordo com a legislação, para que o produto pudesse ser consumido. Mesmo sendo constatada a possibilidade de *Salmonella* spp. ser veiculada por queijos artesanais, não há relatos sobre a ocorrência de surtos de salmoneloses envolvendo o consumo de QMA (Costanzo *et al.*, 2020).

## 3.8. Qualidade físico-química do queijo Minas artesanal

O caráter artesanal de produção de queijos confere uma heterogeneidade de suas características. Conforme abordado, cada queijaria tem sua própria rotina e modo de produção, além de “segredos” que perpetuam pelas famílias ao longo das gerações. Nesse sentido, o estudo de parâmetros físico-químicos do QMA é uma forma de buscar determinar um padrão de identidade e qualidade desses produtos (Meneses, 2006).

Além disso, baseado em alguns padrões físico-químicos, é possível classificar o produto de acordo com suas características (teores de gordura e umidade, por exemplo) e garantir o atendimento a alguns parâmetros que estão estabelecidos nas legislações (Brasil, 1996; Minas Gerais, 2008).

O perfil físico-químico dos queijos também pode ser um marcador usado para determinar a identificação geográfica, como já estabelecido para os QMA produzidos na Canastra e no Serro (Wilkinson *et al.*, 2017).

### 3.8.1. Acidez e pH

A acidez dos queijos é uma medida da concentração total de ácidos nesses produtos. Os ácidos orgânicos presentes em queijos são oriundos da fermentação das moléculas de lactose. Apesar de aproximadamente 98 % da lactose ser eliminada junto ao soro, uma pequena parcela residual permanece na massa do queijo, servindo como substrato para a fermentação microbiana ao longo da maturação. Tal processo é mediado pelo metabolismo de alguns micro-organismos, com destaque para as BAL. A partir da síntese da enzima  $\beta$ -galactosidase pelas BAL, a molécula de lactose é clivada a galactose e glicose. Em seguida, ambos os monossacarídeos participam de vias metabólicas, como a via das pentoses fosfatos e/ou via Embden-Meyerhof-Parnas, dando origem ao ácido láctico e outros ácidos orgânicos (Wu e Shah, 2017). Em menor grau de importância, a fermentação da lactose residual também pode ser realizada por outros grupos microbianos, como os coliformes e algumas leveduras (Zheng *et al.*, 2018).

Califano e Bevilacqua (2000) destacaram que o ácido láctico pode compor até 89 % do total de ácidos orgânicos presentes em queijos, sendo um composto fundamental no desenvolvimento de sabor e manutenção da qualidade do produto. Nesse sentido, o acúmulo de ácidos orgânicos em queijos torna o meio impróprio para o estabelecimento e desenvolvimento de alguns micro-organismos, incluindo aqueles de importância sanitária (Wemmenhove *et al.*, 2016).

Embora sejam parâmetros relacionados, a acidez e o pH dos queijos retratam medidas distintas. Conforme abordado, a acidez titulável é um parâmetro que expressa a quantidade de ácido láctico por unidade de massa da amostra. Por outro lado, o pH é uma escala logarítmica invertida na base 10 da concentração dos íons hidrogênio ( $H^+$ ), que abrange 14 ordens de magnitude. Esses íons se originam da dissociação das moléculas de ácido e são os elementos que, efetivamente, tornam o meio impróprio para o desenvolvimento de micro-organismos. Dessa forma, o pH de um produto, como os queijos, não é influenciado unicamente pela concentração de ácidos presentes, mas também pela concentração de suas bases conjugadas. Baseado nisso, observa-se que o desenvolvimento de acidez predispõe a dissociação de ácidos, com consequente liberação de íons  $H^+$  e diminuição do valor de pH (Sadler e Murphy, 2010).

Embora não existam padrões de identidade e qualidade estabelecidos para a acidez titulável e pH de queijos, estudos científicos propõem alguns valores considerados adequados para o controle da qualidade: acidez titulável de 0,14 a 0,86 g/100 g de ácido láctico; e pH de 4,2 a 6,5 (Trmčić *et al.*, 2017; Alizadeh *et al.*, 2019). Em relação ao QMA, estudos demonstraram que a acidez titulável pode variar de 0,03 a 0,93 g/100 g de ácido láctico; e o pH de 4,61 a 6,48 (Oliveira, 2014; Costa Júnior *et al.*, 2014; Sales, 2015; Castro *et al.*, 2016; Figueiredo, 2018).

### 3.8.2. Umidade e extrato seco total

A composição bromatológica de queijos pode ser dividida em duas frações: a umidade e a matéria seca. A umidade representa a quantidade de água por unidade de amostra. A matéria seca, também denominada de sólidos totais ou extrato seco total, representa a soma da concentração de todos os



compostos sólidos que compõem o queijo, como gordura, proteína, lactose e minerais. Dessa forma, a soma do teor da umidade e do teor de sólidos totais abrange a matéria natural do queijo, ou seja, a totalidade dos elementos que o constitui (IDF, 1982; IDF, 1987).

Durante o processo bioquímico de transformação do leite em queijo, a quimosina (enzima proteolítica do coalho) cliva a molécula de  $\kappa$ -caseína entre os aminoácidos fenilalanina (na posição 105 da cadeia peptídica) e metionina (posição 106). Após essa reação, a  $\kappa$ -caseína é dividida em duas porções: a para- $\kappa$ -caseína (parcela insolúvel que interage com outros componentes sólidos do leite originando a massa do queijo) e a caseinomacropéptido (parcela solúvel que é eliminado junto ao soro) (Shayeh *et al.*, 2017). A partir desse ponto, há uma separação entre a massa do queijo (que concentra a maioria dos componentes sólidos como gordura e caseínas) e o soro (que carrega maior parcela da lactose e proteínas solúveis). Formada a massa do queijo, essa tem a tendência de perder umidade ao longo do tempo, seja pela continuidade do processo de sinérese e/ou pela evaporação superficial de água. Em contrapartida, com a perda de umidade observa-se um efeito de concentração que resulta no aumento do teor de sólidos (Oliveira, 2014).

De acordo com a Portaria nº 146/1996, queijos podem ser classificados de acordo com o teor de umidade em queijos de baixa umidade ou massa dura (umidade de até 35,9 %), média umidade ou massa semi-dura (umidade entre 36,0 e 45,9 %), alta umidade ou macios (umidade entre 46,0 e 54,9 %) e muita alta umidade ou moles (umidade superior a 55,0 %) (Brasil, 1996).

Segundo a Lei Estadual nº 14.185/2002, inicialmente ficou estabelecido um teor de umidade de até 54 % para QMA (Minas Gerais, 2002b). Com isso, ele seria classificado como um queijo de alta umidade de acordo com a Portaria 146/1996 do MAPA (Brasil, 1996). Entretanto, a perda de umidade que ocorria em queijos durante a maturação impedia que o produto pudesse apresentar valores próximos ao estabelecido. Para contornar tal imbróglio, foi publicado o Decreto Estadual nº 44.864/2008 que modificou o regulamento da Lei nº 14.185. Com isso, o valor máximo de umidade foi alterado para 45,9 %, fazendo com que o QMA pudesse ser classificado como um queijo de baixa umidade (Minas Gerais, 2008).

O QMA tende a apresentar uma diminuição do teor de umidade ao longo da maturação e, conseqüentemente, aumento da concentração de sólidos. De acordo com estudos, o teor de umidade do QMA pode variar de 20,98 a 56,64 g/100g (Oliveira, 2014; Costa Júnior *et al.*, 2014; Sales, 2015; Castro *et al.*, 2016; Figueiredo, 2018).

### 3.8.3. Resíduo mineral fixo e cloretos

O resíduo mineral fixo, também denominado de cinzas, representa a parcela dos componentes inorgânicos dos queijos. O teor de cloretos representa uma parcela do resíduo mineral fixo e se origina, principalmente, do cloreto de sódio adicionado ao queijo durante a etapa de salga (Hoffmann *et al.*, 2020).

Os minerais presentes no queijo se originam de matérias-primas utilizadas na elaboração, como o leite cru, o soro-fermento e o cloreto de sódio. O leite cru é uma importante fonte de macrominerais (cálcio, magnésio, fósforo, potássio e sódio) e microminerais (bório, cobalto, cobre, ferro, manganês, molibdênio, selênio e zinco) considerados fundamentais à nutrição humana (Zwierzchowski e Ametaj, 2019). Por ser um produto resultante da sinérese dos queijos

após o processo de salga, o soro-fermento carrega consigo o cloreto de sódio que se dissolve na água do queijo e os minerais contidos no leite que são eliminados junto ao soro.

Minerais são importantes nutrientes relacionados à saúde dos ossos e dentes. Estima-se que cerca de 70 % do cálcio que um indivíduo necessita é obtido pelo consumo de derivados lácteos, sendo o queijo a principal fonte para adultos. Por outro lado, alguns minerais como sódio, oriundo principalmente do cloreto de sódio adicionado na etapa de salga dos queijos, podem estar relacionados ao aumento do risco de ocorrência de afecções cardiovasculares (Manuelian *et al.*, 2017). Metais pesados como alumínio, arsênio, cádmio, crômio, cobre, ferro, mercúrio, manganês, selênio, níquel, chumbo e zinco, também são exemplos de minerais considerados prejudiciais à saúde do consumidor. Esses compostos são acumulados ao longo da cadeia alimentar e podem ser eliminados junto ao leite (Christophoridisa *et al.*, 2019; Zwierzchowski e Ametaj, 2019).

Além da importância nutricional, minerais como cálcio, enxofre, fósforo e magnésio exercem efeito sobre o processo tecnológico de produção de queijos. Esses elementos participam efetivamente das etapas da formação do coágulo e sinérese, além de influenciarem aspectos sensoriais como a textura da massa (Levkov *et al.*, 2017).

De acordo com Murtaza *et al.* (2014), a maioria dos minerais não se relacionam a processos microbiológico, bioquímicos ou metabólicos do queijo durante a maturação. Portanto, o teor desses compostos é influenciado unicamente pelo efeito de concentração em virtude da perda de umidade dos queijos.

Em QMA foi constatado que o teor de resíduo mineral fixo pode variar de 3,76 a 5,59 g/100 g; e o teor de cloretos apresenta concentrações entre 1,52 e 1,78 g/100 g (Figueiredo, 2018).

### 3.8.4. Gordura

Gorduras são compostos orgânicos de alto peso molecular que desempenham funções nutritivas, energéticas e sensoriais nos alimentos. Em queijos, as gorduras oriundas do leite cru são consideradas o principal constituinte sólido e se encontram, principalmente, na forma de triglicerídeos e ácidos graxos (Vieitez *et al.*, 2016).

A gordura láctea é considerada uma das mais importantes fontes de ácido linoleico conjugado da dieta humana. Diversas propriedades promotoras de saúde são atribuídas a esse composto, como os efeitos anticarcinogênicos, anti-aterogênicos, anti-obesidade e anti-inflamatório (Bodkowski *et al.*, 2016). Por outro lado, produtos de origem animal, em geral, contêm níveis considerados de ácidos graxos saturados e colesterol, que podem estar relacionados ao desenvolvimento de doenças vasculares, como trombose e arteriosclerose (Cerutti *et al.*, 2016).

A gordura também desempenha importante função na percepção gustativa do alimento pelos consumidores, uma vez que esse componente se associa às sensações de suavidade, cremosidade e adstringência. Além disso, propriedades reológicas de queijos, como a viscoelasticidade, são diretamente influenciadas por esse nutriente (Ningtyas *et al.*, 2017).

Ao longo da maturação, o teor de gordura nos queijos tende a aumentar em função da concentração dos sólidos pela perda de umidade. Por outro lado, também é observada ocorrência de lipólise mediada por enzimas de origem microbiana ou láctea. Essa reação resulta na clivagem

dos triglicerídeos, mais especificamente dos ácidos graxos ligados às moléculas de glicerol. Os componentes liberados pela lipólise servem de substratos para produção de compostos orgânicos voláteis, importantes para o desenvolvimento de características sensoriais dos queijos. Entretanto, quando a lipólise ocorre de maneira intensa pode levar a alterações não desejáveis das características sensoriais dos queijos (Juan *et al.*, 2015).

A Portaria MAPA 146/1996 estabelece uma classificação de queijos baseada no teor de gordura no extrato seco (GES). Dessa forma, os queijos podem ser classificados como extra gordo ou duplo creme (teor mínimo de 60 % de GES), gordo (45,0 a 59,9 %), semi-gordo (25,0 a 44,9%), magro (10,0 a 24,9 %) e desnatado (menor que 10,0 %) (Brasil, 1996). Entretanto, o teor de GES independe do teor de umidade do queijo e tende a manter sua concentração durante a maturação ou oscilar em função da ocorrência de lipólises e/ou proteólises. Estudos mostraram que o teor de gordura de QMA pode variar de 17,33 a 44,11 g/100 g; e o teor de GES do QMA oscila de 49,28 a 63,74 g/100 g (Oliveira, 2014; Sales, 2015; Castro *et al.*, 2016; Figueiredo, 2018).

### 3.8.5. Proteínas e compostos nitrogenados

O perfil proteico do queijo é representado principalmente por caseínas, originadas da matriz láctea. As principais caseínas que podem ser encontradas em queijos são  $\alpha$ 1-caseína,  $\alpha$ 2-caseína,  $\beta$ -caseína, e  $\kappa$ -caseína. Peptídeos oriundos da lise dessas moléculas também são encontrados na composição do queijo. O fenômeno da proteólise é mediado por enzimas microbianas, lácteas e do agente coagulante. Essas enzimas são capazes de clivar as caseínas em moléculas menores, denominadas peptídeos. Esses produtos podem ainda ser reduzidos a aminoácidos livres e compostos orgânicos voláteis que contribuem para a caracterização sensorial dos queijos. Em alguns tipos de queijos, como o *Cheddar*, parâmetros de proteólise de caseínas são utilizados como marcadores da maturação (Gan *et al.*, 2016; Fontenele *et al.*, 2017).

Proteínas do soro, como a própria designação sugere, são eliminadas nessa fração láctea durante a obtenção da massa do queijo. Entretanto, teores residuais desses compostos permanecem na massa. Elas também podem ser indicativas do rendimento de produção, uma vez que a  $\alpha$ -lactoalbumina exerce um efeito positivo na recuperação de gordura pela massa de queijos. Em contraste, a  $\beta$ -lactoglobulina têm uma influência negativa no processo de produção de queijos, principalmente no que se refere à perda de nutrientes durante a separação entre a massa do queijo e o soro (Cipolat-Gotet *et al.*, 2018).

Além de desempenhar função nutritiva, as proteínas também são importantes para a determinação de propriedades reológicas, físico-químicas, micro-estruturais e sensoriais dos queijos (Guinee, 2016). Nesse sentido, Ipsen (2017) observou que a adição de proteínas de soro em queijos é capaz de suavizar a textura e melhorar o derretimento.

Por outro lado, proteínas lácteas podem estar relacionadas à ocorrência de reações alérgicas em alguns indivíduos. Proteínas do soro e caseínas, sendo essas últimas mais importantes na composição dos queijos, possuem epítomos reconhecidos por imunoglobulina E (IgE) específica de pacientes alérgicos (Biscola *et al.*, 2018).

Além de proteínas, peptídeos e aminoácidos, outros compostos nitrogenados, como ureia e ácido úrico, também são componentes de queijos. A presença dessas substâncias no queijo se relaciona à oferta excedente de compostos nitrogenados na dieta animal. O excesso de compostos nitrogenados consumidos é metabolizado e excretado junto ao leite. Martin *et al.* (1997)

observaram que queijos produzidos a partir de leites que continham teores de 0,24 a 0,49 g/L de ureia apresentaram alterações na composição química e em características de textura, além de menor acidificação durante a maturação.

De acordo com estudos sobre o QMA, o teor de proteínas desse produto pode variar de 14,06 a 33,43 g/100 g (Oliveira, 2014; Sales, 2015; Castro *et al.*, 2016; Figueiredo, 2018).

## 4. MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1. Locais e épocas de coletas de amostras

A organização e o planejamento da pesquisa e a coleta das amostras foram feitas com o apoio de instituições como a Secretaria de Estado de Agricultura, Pecuária e Abastecimento de Minas Gerais (Seapa), Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais (Epamig), Empresa de Assistência Técnica e Extensão Rural do Estado Minas Gerais (Emater) e Universidade Federal de São João del-Rei (UFSJ).

As amostras foram coletadas em quatro das cinco queijarias registradas pelo IMA na mesorregião do Campo das Vertentes, situadas nos municípios de Coronel Xavier Chaves (dois estabelecimentos), São João del-Rei e Tiradentes (Minas Gerais, 2022d). A coleta de amostras foi iniciado (dia um) em 20 de novembro de 2019 (época das chuvas) e em 01 de julho de 2021 (época da seca).

A distribuição de precipitações na região do Campo das Vertentes nos anos de 2019 e 2021, pode ser observada, respectivamente, no ANEXO I e no ANEXO II. Os dados do Instituto Nacional de Meteorologia (INMET) evidenciam que as coletas foram feitas em condições climáticas adequadas ao que o estudo se propunha, com o regime de chuvas em 2019 se iniciando no mês de outubro e a estiagem em 2021 começando em meados de junho (INMET, 2021). Além disso, nas coletas realizadas em 2021 (período seco) foi possível instalar *dataloggers* RC-4HC (*Elitech*, Brasil) no setor de maturação das queijarias. Os aparelhos mensuravam a temperatura e umidade do local em intervalos de 12 horas, durante todo o período de realização do estudo (60 dias), totalizando 120 medições. Os dados obtidos pelos *dataloggers* podem ser observados no ANEXO III.

### 4.2. Amostragem de água, leite cru, soro-fermento, *swabs* de superfícies e queijo Minas artesanal

Amostras de água foram coletadas diretamente a partir das torneiras do interior da queijaria, sendo acondicionadas em dois frascos esterilizados, destinados respectivamente às análises microbiológicas (no qual se adicionou à amostra 0,1 mL de tiosulfato de sódio a 10 %) e físico-químicas. Da mesma forma, o soro-fermento e o leite cru (usados na produção dos queijos) foram coletados em condições assépticas, sendo que alíquotas do leite cru também foram amostradas em frascos contendo conservantes azidiol (destinado para a análise de contagem padrão em placas - CPP) e bronopol (destinado para análise da composição centesimal e contagem de células somáticas - CCS).

*Swabs* estéreis embebidos com solução salina peptonada (0,85 % de cloreto de sódio e 0,1 % de peptona bacteriológica) foram utilizados para coletar amostras nas superfícies de bancada de produção e de prateleiras destinadas ao acondicionamento de queijos com 22 dias de maturação. A amostragem foi feita friccionando os *swabs* por 20 segundos em cinco áreas distintas das superfícies, delimitadas por molde de 50 cm<sup>2</sup> esterilizado. Em seguida, os *swabs* foram acondicionados em tubos contendo 10 mL de solução salina peptonada (0,85 % de cloreto de sódio e 0,1 % de peptona bacteriológica).

Os queijos produzidos a partir do soro-fermento e leite cru amostrados foram coletados após períodos de um, sete, 14, 22 e 60 dias de maturação, realizada à temperatura ambiente, nas queijarias de origem. Foram coletadas peças do mesmo lote de produção. Os queijos foram retirados diretamente das bancadas de produção ou prateleiras de maturação, envoltos em embalagens usualmente utilizadas pelos produtores para comercialização dos queijos e acondicionados em sacos plásticos de primeiro uso. Para cada período de maturação foram coletados dois queijos para realização de um *pool* no momento das análises.

Todas as amostras, independentemente da natureza e do dia de coleta, foram transportadas sob refrigeração, em caixas isotérmicas contendo gelo reciclável, até o Departamento de Tecnologia e Inspeção de Produtos de Origem Animal da Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais (DTIPOA/EV/UFMG). As análises foram iniciadas no prazo máximo de 12 horas após as coletas.

### **4.3. Análises microbiológicas**

Para realização das análises microbiológicas, foram coletadas 25 g das amostras de queijo e 25 mL de leite cru, soro-fermento e água. As alíquotas mencionadas foram transferidas para frascos contendo 225 mL de salina peptonada (0,85 % de cloreto de sódio e 0,1 % de peptona bacteriológica), caracterizando a diluição  $10^{-1}$ . A partir dessa diluição, foram realizadas diluições seriadas, transferindo 1 mL para tubos contendo 9 mL de salina peptonada (0,85 % de cloreto de sódio e 0,1 % de peptona bacteriológica). A amostra de *swab* também foi submetida à diluição seriada, considerando o tubo utilizado na amostragem como a diluição  $10^{-1}$ .

Todas as análises microbiológicas foram realizadas no Laboratório de Microbiologia de Alimentos do DTIPOA/EV/UFMG, exceto a contagem padrão em placas do leite cru, feita no Laboratório de Análise da Qualidade do Leite da UFMG (LabUFMG).

#### **4.3.1. Água**

As amostras de água das queijarias foram analisadas para determinação do número mais provável (NMP) de coliformes a 30 °C e 45 °C e contagem de micro-organismos mesófilos aeróbios.

#### **4.3.2. Swabs de superfície**

As seguintes análises microbiológicas foram realizadas para as amostras de *swabs* de superfícies: NMP de coliformes a 30 °C e 45 °C, contagens de *Staphylococcus* spp. e *Staphylococcus* coagulase positivo e de BAL.

#### **4.3.3. Soro-fermento**

Foram analisados os seguintes parâmetros microbiológicos de qualidade de soro-fermento: NMP de coliformes a 30 °C e a 45 °C; contagens de *Staphylococcus* spp. e *Staphylococcus* coagulase positivo, BAL, bolores e leveduras; e pesquisa de *Salmonella* spp..

#### 4.3.4. Leite cru

As amostras de leite cru utilizado para a produção de queijos foram analisadas quanto ao NMP de coliformes a 30 °C e a 45 °C; contagens de *Staphylococcus* spp. e *Staphylococcus* coagulase positivo, BAL e bolores e leveduras; e pesquisa de *Salmonella* spp., de inibidores, CPP e CCS.

#### 4.3.5. Queijo Minas artesanal

QMA do Campo das Vertentes de diferentes períodos de maturação foram analisados quanto ao NMP de coliformes a 30 °C e 45 °C; contagens de *Staphylococcus* spp. e *Staphylococcus* coagulase positivo, BAL e bolores e leveduras; e pesquisa de *Salmonella* spp..

### 4.4. Metodologias utilizadas nas avaliações de parâmetros microbiológicos de qualidade

#### 4.4.1. Contagem de micro-organismos mesófilos aeróbios

A contagem de mesófilos nas amostras de água foi feita a partir do plaqueamento, por *pour-plate*, de 1 mL das diluições  $10^0$ ,  $10^{-1}$  e  $10^{-2}$  em ágar padrão para contagem (*Plate Count Agar – PCA*) (*Kasvi, São José dos Pinhais, Brasil*). A leitura das placas foi realizada após incubação das mesmas a  $36 \pm 1$  °C por 48 horas e o resultado foi expresso em unidade formadora de colônia por mililitro (UFC/mL) (Morton, 2001).

#### 4.4.2. Número mais provável de coliformes a 30 °C e 45 °C

Para a realização do teste presuntivo de coliformes nas amostras de água, 10 mL da diluição  $10^0$  foram inoculados em uma série de dez tubos contendo 10 mL de caldo lauril sulfato de sódio duplo (*Himedia, Mumbai, Índia*) e tubos de Durham invertidos. Da mesma forma, foram transferidos 1 mL das diluições  $10^0$  e  $10^{-1}$  para séries de dez tubos contendo 10 mL de caldo lauril sulfato de sódio simples (*Himedia*) e tubos de Durham invertidos. Para as amostras de soro-fermento e leite cru, 1 mL das diluições  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$  e  $10^{-4}$  foram inoculados em série de três tubos contendo 10 mL de caldo lauril sulfato de sódio simples (*Himedia*) e tubos de Durham invertidos. Para as amostras de *swabs* e queijos, 1 mL das diluições de  $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$  e  $10^{-5}$  foram transferidos para séries de três tubos contendo 10 mL de caldo lauril sulfato de sódio simples (*Himedia*) e tubos de Durham invertidos.

Após incubação a  $36 \pm 1$  °C por 48 horas, os tubos que apresentaram efervescência no caldo quando levemente agitado e/ou acúmulo de gás em pelo menos 1/10 do tubo de Durham foram submetidos à prova confirmativa. Para tal finalidade, alíquotas de 0,1 mL dos conteúdos dos tubos positivos no teste presuntivo foram transferidas para tubos contendo caldo verde brilhante lactose 2 % (*Acumedia, Estados Unidos*) e caldo EC (*Himedia*), ambos com tubos de Durham invertidos em seu interior. Após inoculação, os tubos foram incubados a  $36 \pm 1$  °C (caldo verde brilhante lactose 2 %) e  $45 \pm 0,2$  °C (caldo EC) por 48 horas. Em seguida, foi observada a formação de gases (mínimo 1/10 do volume total do tubo de Durham ou efervescência quando agitado levemente) que determinavam a presença de coliformes a 30 °C no caldo verde brilhante

bile lactose 2 % e coliformes a 45 °C no caldo EC. O resultado foi expresso a partir do número de tubos com resultado positivo para cada diluição, seguindo tabela de NMP de McGrady (Kornacki e Johnson, 2001).

O controle positivo foi feito com a amostra *E. coli* American Type Culture Collection (ATCC) 25922.

#### 4.4.3. Contagem e identificação de bactérias ácido-láticas

A contagem de BAL nessas amostras foi realizada em ágar De Man, Rogosa e Sharpe – MRS (*Oxoid Limited, Basingstoke, Reino Unido*), a partir do plaqueamento, por *spread-plate*, de alíquotas de 0,1 mL das diluições  $10^{-4}$ ,  $10^{-5}$  e  $10^{-6}$  (*swabs*); e  $10^{-3}$ ,  $10^{-5}$  e  $10^{-7}$  (amostras de leite cru, soro-fermento e queijos) (IDF, 1988; Resende *et al.*, 2011). Os resultados foram expressos em UFC/mL (leite cru e soro-fermento), UFC/g (queijos) e UFC/cm<sup>2</sup> (*swabs*).

As colônias de BAL obtidas a partir do cultivo das amostras foram identificadas por espectrometria de massas *Matrix Assisted Laser Desorption Ionization - Time Of Flight* (MALDI-TOF). Para tal finalidade, foi utilizando o equipamento Microflex<sup>TM</sup> (Bruker Daltonics - Bremen, Alemanha) com seu banco de dados correspondente. Antes das análises, o equipamento foi calibrado com um padrão de teste bacteriano (*E. coli* DH5 alfa; Bruker Daltonic). Os espectros obtidos foram analisados pelo programa MALDI Biotyper (Bruker Daltonics). Uma única colônia bacteriana, fresca, foi retirada por vez das placas de Petri contendo ágar MRS e transferida para uma placa alvo de aço inoxidável com adição subsequente de 1 µL de ácido fórmico (70 %) e 1 µL de ácido  $\alpha$ -ciano-4-hidroxicinâmico que em seguida foi acoplada ao equipamento. O espectro de massa gerado, de acordo com o perfil proteico das bactérias foi comparado com informações do banco de dados. Para interpretação das pontuações, utilizou-se os critérios recomendados pelo fabricante, que define os escores  $\geq 2.000$  a identificação em nível de espécie, 1.700 a 2.000, identificação em nível de gênero e escores inferiores a 1.700 não foi associado a nenhum micro-organismo (Singhal *et al.*, 2015).

As amostras identificadas pela espectrometria de massas MALDI-TOF como BAL foram repicadas em caldo MRS e, posteriormente, transferidas para tubos *Eppendorfs* esterilizados. Nos mesmos tubos também se adicionou solução glicerina a 60 % para crioproteção das amostras bacterianas, na proporção 1:2 (caldo MRS com a BAL ativada:glicerina a 60 %). Em seguida, o conteúdo dos *Eppendorfs* foi homogeneizado e eles foram armazenados em *freezer* a – 20 °C.

#### 4.4.4. Contagem de *Staphylococcus* spp. e teste de coagulase

As contagens de *Staphylococcus* spp. foram feitas a partir de plaqueamento, por *spread-plate*, de alíquotas de 0,1 mL das diluições  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$  e  $10^{-5}$  (amostras de *swabs*, soro-fermento, leite cru e queijos) em ágar Baird Parker (*Himedia*) enriquecido com 5 % (v/v) de emulsão de gema de ovo 50 % e telurito de potássio 3,5 % (*Himedia*). Após incubação a 36 °C  $\pm$  1 °C por 48 horas, foi feita a contagem e classificação das colônias em típicas (negras brilhantes com anel opaco, rodeadas por um halo claro, transparente e destacado sobre a opacidade do meio) e atípicas (acinzentadas ou negras brilhantes, sem halo ou com apenas um dos halos).

Três colônias de cada tipo foram transferidas para tubos contendo caldo *Brain Heart Infusion - BHI* (*Himedia*) que, posteriormente foram incubados a 36 °C  $\pm$  1 °C por 24 horas. Na sequência, foi realizado o teste de coagulase transferindo 0,3 mL do conteúdo de cada tubo anterior para



tubos estéreis contendo 0,3 mL de plasma de coelho reconstituído (*Laborclin, Vargem Grande dos Pinhais, Brasil*). Após incubação a  $36\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$  por seis horas foi verificada a formação ou não de coágulos organizados e firmes. Dessa forma, foi possível determinar o número de *Staphylococcus* coagulase positivo a partir da fórmula (Lancette e Tatini, 2001):

$$\textit{Staphylococcus} \text{ coagulase positivo (UFC/mL ou g)} = \frac{C \times c \times d}{r}$$

Sendo que:

C = número de colônias contadas

c = número de colônias confirmadas

r = número de colônias repicadas

d = diluição utilizada

O controle positivo das contagens de *Staphylococcus* spp. e *Staphylococcus* coagulase positivo foi feito com a amostra *S. aureus* ATCC 33591.

#### 4.4.5. Pesquisa de bolores e leveduras

Alíquotas de 0,1 mL das diluições  $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$ ,  $10^{-5}$  (amostras de leite, soro-fermento e queijos) foram inoculadas, por *spread-plate*, em ágar batata dextrose 2 % (*Acumedia*), adicionado de 1,5 % (v/v) de ácido tartárico (*Synth, Diadema, Brasil*) a 10 %. As placas foram incubadas a  $25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ , por sete dias para posterior contagem de colônias e expressão dos resultados em UFC/mL (leite cru e soro-fermento) e UFC/g (queijos) (Tournas *et al.*, 2001).

#### 4.4.6. Pesquisa de *Salmonella* spp.

Para a realização da pesquisa de *Salmonella* spp., 25 g de queijo e 25 mL de soro-fermento e leite cru foram adicionados de 225 mL de salina peptonada tamponada 1 %. Após permanecerem em temperatura ambiente por uma hora, as amostras foram incubadas em estufa a  $36\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$  por 24 horas, caracterizando a etapa de pré-enriquecimento.

Na sequência, as amostras foram submetidas à etapa de enriquecimento, que consistiu na transferência de 1 mL e 0,1 mL das amostras pré-enriquecidas para, respectivamente, tubos contendo 10 mL de caldo Selenito Cistina (*Himedia*) e 10 mL de caldo Rappaport Vassiliadis (*Acumedia, Baltimore, Estados Unidos*).

Após a incubação dos tubos em banho-maria a  $41\text{ }^{\circ}\text{C}$  por 24 horas, foi realizada a etapa de plaqueamento seletivo. As amostras, de ambos os caldos, foram estriadas em ágar verde brilhante vermelho de fenol lactose sacarose – BPLS (*Acumedia*), ágar xilose-lisina-desoxicolato – XLD (*Acumedia*) e ágar Hektoen entérico (*Himedia*). Em seguida, as placas foram incubadas em estufa a  $36\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$  por 24 horas (Andrews *et al.*, 2001).

As colônias suspeitas nos três meios de cultura (Ágar BPLS: colônias incolores ou de cor rosada, entre translúcidas a ligeiramente opacas, ou verde-amareladas quando rodeadas de micro-organismos fermentadores; Ágar XLD: colônias vermelhas com ou sem enegrecimento do centro;

Ágar Hektoen: colônias verde-azuladas com ou sem o enegrecimento pelo acúmulo de sulfeto de hidrogênio) foram submetidas à identificação proteômica por meio da espectrometria de massas MALDI-TOF (Singhal *et al.*, 2015).

O controle positivo foi feito com a amostra *Salmonella enterica* sorovar Typhimurium ATCC 14028.

#### **4.4.7. Contagem padrão em placas e contagem de células somáticas**

A avaliação da CPP foi realizada nas amostras de leite cru conservadas com azidiol, pela metodologia de citometria de fluxo (Suhren e Walte, 2000) em equipamento eletrônico BactoCount IBC (*Bentley Instruments Incorporated*®, Chaska, Minnesota, Estados Unidos) (Bentley, 2002). A CCS foi feita de forma automatizada em equipamento eletrônico Bentley CombiSystem 2300® da Bentley Instruments Incorporated® (Bentley, 1998; IDF, 2006).

#### **4.4.8. Pesquisa de inibidores de crescimento microbiano**

A pesquisa de inibidores de crescimento microbiano no leite cru foi realizada utilizando o Kit Delvotest® (Hennart e Faragher, 2012).

### **4.5. Análises físico-químicas**

Todas as análises físico-químicas das amostras de água, soro-fermento e queijos e as análises de acidez titulável e pH do leite cru foram feitas em triplicata, no Laboratório de Análises Físico-Químicas I do DTIPOA/EV/UFMG. A composição centesimal do leite cru foi realizada em equipamento eletrônico no LabUFMG.

#### **4.5.1. Água**

Os parâmetros físico-químicos da água foram: acidez, alcalinidade, cloro residual, cloretos, dureza e pH. As análises foram realizadas em triplicata, conforme metodologias propostas por APHA (2005).

##### **4.5.1.1. Acidez**

Para determinação da acidez da água foram transferidos 100 mL das amostras para *Erlenmeyers*, nos quais também se adicionaram quatro gotas de fenolftaleína 1 %. Em seguida, procedeu-se titulação com solução de hidróxido de sódio 0,01 N até a amostra adotar coloração rósea. Dessa forma, foi possível determinar a acidez das amostras com base na fórmula a seguir (APHA, 2005):

$$\text{Acidez (mg/L de CO}_2\text{)} = 4,4 \times V$$

Sendo que:

4,4 = fator de correção

V = volume da solução de hidróxido de sódio 0,01 N gasto na titulação, em mL

#### 4.5.1.2. Alcalinidade

Para mensurar a alcalinidade das amostras, 100 mL de água foram transferidos para *Erlenmeyers*, nos quais também foram adicionadas três gotas de fenolftaleína 1 %. Quando a solução adquiria a coloração rósea após a adição da fenolftaleína 1 % era feita a titulação com ácido sulfúrico 0,02 N até que ela ficasse novamente incolor. Em seguida, foram adicionadas três gotas do indicador alaranjado de metila e procedeu-se titulação com ácido sulfúrico 0,02 N até a mudança da coloração amarelada para vermelho-tijolo. Dessa forma, foi possível determinar a alcalinidade das amostras com base na fórmula a seguir (APHA, 2005):

$$\text{Alcalinidade (mg/L de CaCO}_3\text{)} = 10 \times V$$

Sendo que:

10 = fator de correção

V = volume da solução de ácido sulfúrico 0,02 N gasto na titulação, em mL

#### 4.5.1.3. Cloro residual

A mensuração do teor de cloro residual das amostras foi feita a partir da transferência de 50 mL de água para *Erlenmeyers*, nos quais também foram adicionados 5 mL de iodeto de potássio 15 %, 5 mL de ácido clorídrico 10 % e cinco gotas de solução de amido 1 %. Após a adição da solução de amido 1 %, a mudança de coloração da solução para azul indicava a presença de cloro. A quantificação do cloro foi feita a partir da titulação com tiosulfato de sódio 0,01 N até que a solução ficasse novamente incolor. Dessa forma, foi possível determinar o teor de cloro residual das amostras com base na fórmula a seguir (APHA, 2005):

$$\text{Cloro residual (mg/L de Cl}_2\text{)} = 7,09 \times V$$

Sendo que:

7,09 = fator de correção

V = volume da solução de tiosulfato de sódio 0,01 N gasto na titulação, em mL

#### 4.5.1.4. Cloretos

A determinação do teor de cloretos das amostras foi feita a partir da transferência de 100 mL de água para *Erlenmeyers*, nos quais foram também adicionados 0,05 g de carbonato de cálcio e cinco gotas de cromato de potássio 5 %. Em seguida, foi feita titulação com nitrato de prata 0,01 N até que a solução mudasse sua tonalidade amarela-esverdeada para vermelho-tijolo. Dessa forma, foi possível determinar o teor de cloretos das amostras com base na fórmula a seguir (APHA, 2005):

$$\text{Cloretos (mg/L de Cl}^{-}\text{)} = 5,845 \times V$$

Sendo que:

5,845 = fator de correção

V = volume da solução de nitrato de prata 0,01 N gasto na titulação, em mL

#### 4.5.1.5. Dureza

Para determinar a dureza das amostras, 50 mL de água foram transferidos para *Erlenmeyers*, nos quais também foram adicionados 2 mL de solução tampão (pH 10) e indicador Negro de Eriocromo T, até que a solução adotasse coloração púrpura. Por fim, foi feita titulação com solução EDTA 0,01 N até mudança de coloração para azul. Dessa forma, foi possível determinar a dureza das amostras com base na fórmula a seguir (APHA, 2005):

$$\text{Dureza (mg/L de CaCO}_3\text{)} = 20 \times V$$

Sendo que:

20 = fator de correção

V = volume da solução de EDTA 0,01 N gasto na titulação, em mL

#### 4.5.1.6. pH

A análise de pH das amostras foi feita transferindo 50 mL de água para um béquer. Em seguida, submergiu-se à amostra o eletrodo de pHmetro (Gehaka PG1800, São Paulo, Brasil) previamente calibrado com soluções padrões de pH quatro e sete, mantido até estabilidade da resposta (Helrich, 1990).

### 4.5.2. Soro-fermento

#### 4.5.2.1. Acidez titulável e pH

Adaptou-se a metodologia para avaliação da acidez titulável de leite para avaliação da acidez titulável do soro-fermento (Merck, 1993). Foram transferidos 10 mL de soro-fermento para um béquer, no qual foram adicionadas cinco gotas da solução de fenolftaleína a 1 %. Em seguida, foi feita a titulação com solução Dornic (hidróxido de sódio N/9), até aparecimento de coloração rósea persistente por aproximadamente 30 segundos. Cada mililitro de solução Dornic gasto na titulação equivalia a 1 °D ou 9 mg de ácido láctico.

A análise de pH foi feita transferindo 50 mL do soro-fermento para um béquer. Em seguida, submergiu-se à amostra o eletrodo de pHmetro (Gehaka PG1800) previamente calibrado, mantido até estabilidade da resposta (Helrich, 1990).

#### 4.5.2.2. Teor de cloretos

Para determinação do teor de cloretos, cinco gramas do soro-fermento foram pesados em cadinhos e, em seguida, o material foi introduzido em forno mufla a 550 °C por três horas, para obtenção

de cinzas totalmente brancas. Na sequência, as cinzas foram adicionadas de 50 mL de água destilada morna e transferidas para *Erlenmeyer* de 125 mL, onde também foi adicionado 1 mL de solução de cromato de potássio a 5 %. Por fim, esse conteúdo foi titulado com solução de nitrato de prata 0,1 N, até coloração vermelho tijolo. A concentração de cloretos foi estimada a partir da aplicação da seguinte fórmula (Merck, 1993):

$$\text{NaCl (\%)} = V \times f \times N \times 0,0585 \times 100 \times m$$

Sendo que:

V = volume da solução de nitrato de prata 0,1 N gasto na titulação, em mL

F = fator de correção da solução de nitrato de prata 0,1 N

m = massa da amostra, em gramas

N = representa a normalidade da solução de nitrato de prata 0,1 N

0,0585 = miliequivalente-grama do cloreto de sódio

#### 4.5.3. Leite cru

Os teores percentuais de gordura, de proteína, de lactose e de extrato seco total e de extrato seco desengordurado foram determinados por meio do método de absorção de comprimento de onda na região do infravermelho (IDF, 2013), em equipamento eletrônico Bentley CombiSystem 2300® da Bentley Instruments Incorporated® (Bentley, 1998).

Para a determinação da acidez titulável dessas amostras, foram transferidos 10 mL de leite cru para um béquer, no qual foram adicionadas cinco gotas da solução de fenolftaleína a 1 %. Em seguida, foi feita a titulação com solução Dornic (hidróxido de sódio N/9), até aparecimento de coloração rósea persistente por aproximadamente 30 segundos. Cada mililitro de solução Dornic gasto na titulação equivalia a 1 °D ou 9 mg de ácido láctico (Merck, 1993).

A análise de pH foi feita transferindo 50 mL de amostra para um béquer, no qual o eletrodo de pHmetro (Gehaka PG1800), previamente calibrado, foi submerso e mantido até estabilidade da resposta (Helrich, 1990).

#### 4.5.4. Queijo Minas artesanal

##### 4.5.4.1. Teor de umidade

Os teores percentuais de umidade foram determinados pelo método gravimétrico (IDF, 1987). Para tal finalidade, cinco gramas de cada amostra foram pesados em cadinhos de massa registrada, previamente secados em estufa a  $102\text{ °C} \pm 2\text{ °C}$ , por no mínimo uma hora. Em seguida, o cadinho contendo a amostra foi transferido para estufa a  $102\text{ °C} \pm 2\text{ °C}$ , por duas horas. Depois de retirado da estufa, o cadinho foi esfriado em dessecador por dez minutos e, em seguida, pesado. O procedimento de aquecimento foi repetido por uma hora, de forma consecutiva, até que a diferença de massa entre as pesagens não excedesse 0,001 g. Para a determinação da porcentagem de umidade, foi aplicada a seguinte fórmula (IDF, 1982):

$$\text{Umidade (\%)} = \frac{[(m_0 + m_1) - m_2]}{m_1} \times 100$$

Sendo que:

$m_0$  = massa do cadinho sem amostra

$m_1$  = massa da amostra

$m_2$  = massa do cadinho com amostra com peso estabilizado

#### 4.5.4.2. Resíduo mineral fixo

Para determinar o resíduo mineral fixo das amostras, a matéria seca resultante da análise de umidade foi incinerada em forno mufla a 550 °C por três horas, para obtenção cinzas totalmente brancas. Após esfriar as amostras em dessecadores, os cadinhos contendo as cinzas foram pesados, possibilitando determinar tal parâmetro a partir da fórmula (Merck, 1993):

$$\text{Resíduo mineral fixo (\%)} = \frac{(m_3 - m_0)}{m_1} \times 100$$

Sendo que:

$m_0$  = massa do cadinho sem amostra

$m_1$  = massa da amostra

$m_3$  = massa do cadinho com cinzas da amostra

#### 4.5.4.3. Teor de cloretos

A determinação do teor de cloretos foi feita a partir do resíduo obtido na análise do resíduo mineral fixo. As cinzas foram adicionadas de 50 mL de água destilada morna e, na sequência, foram transferidas para *Erlenmeyer* de 125 mL, onde também foi adicionado 1 mL de solução de cromato de potássio a 5 %. Por fim, esse conteúdo foi titulado com solução de nitrato de prata 0,1 N, até coloração vermelho tijolo. A concentração de cloretos foi estimada a partir da aplicação da seguinte fórmula (Merck, 1993):

$$\text{NaCl (\%)} = \frac{V \times f \times N \times 0,0585}{m} \times 100$$

Sendo que:

$V$  = volume da solução de nitrato de prata 0,1 N gasto na titulação, em mL

$F$  = fator de correção da solução de nitrato de prata 0,1 N

$m$  = massa da amostra, em gramas

$N$  = representa a normalidade da solução de nitrato de prata 0,1 N

0,0585 = miliequivalente-grama do cloreto de sódio

#### 4.5.4.4. Teor de gordura

Para a determinação do teor percentual de gordura, as amostras de queijo foram submetidas ao método butirométrico (IDF, 2008). Em balança analítica foram pesados 3 g da amostra diretamente no copo coletor de butirômetros de Van Gulik. Após acoplar e vedar o copo ao

butirômetro, também foram adicionados 5 mL de água morna, 10 mL da solução de ácido sulfúrico e 1 mL de álcool isoamílico. Na sequência, o conteúdo foi homogeneizado e o butirômetro foi transferido para banho-maria a 65 °C para auxiliar na dissolução da amostra. Após completa dissolução, foi feita a adição de água destilada no interior no butirômetro até que o volume alcançasse a última marcação da haste graduada. Feito isso, a borda do butirômetro foi enxugada com papel absorvente e ele foi centrifugado por dez minutos a 1200 RPM em centrífuga de Gerber. A centrifugação permitiu a separação, por densidade, da fase gordurosa da amostra. A leitura do teor percentual de gordura foi feita diretamente na escala da haste graduada do butirômetro, medindo-se a extensão da coluna de gordura.

#### 4.5.4.5. Gordura no extrato seco

O teor de GES foi determinado por fórmula matemática utilizando resultados obtidos nas análises dos teores de gordura e umidade (IDF, 1982; IDF, 1987; IDF, 2008):

$$\text{Gordura no extrato seco (\%)} = \frac{G \times 100}{(100 - U)}$$

Sendo que:

G = teor de gordura

U = teor de umidade

#### 4.5.4.6. Teor de proteína

O método de micro *Kjeldahl* foi utilizado para determinar o teor percentual de proteínas das amostras (IDF, 1993). Foram pesadas, por meio de balança analítica, 0,25 g das amostras no interior de tubos de micro *Kjeldahl*. Em seguida, adicionou-se 2,5 g de mistura catalítica e 7 mL de ácido sulfúrico PA. Os tubos foram aquecidos em bloco digestor a 400 °C por aproximadamente duas horas, até que o líquido se tornasse límpido, de tonalidade azul-esverdeada. Após esfriar, o tubo foi adicionado de 20 mL solução de hidróxido de sódio a 50 % para que a solução se tornasse preto-acinzentada. A mistura foi destilada em *Erlenmeyer* contendo 20 mL de solução de ácido bórico a 4 %, até atingir o volume aproximado de 100 mL. Após a adição de cinco gotas de solução de indicador misto, foi feita titulação com ácido clorídrico 0,1 N até a viragem do indicador. A determinação do teor de nitrogênio na amostra foi estimada a partir da seguinte fórmula:

$$\text{Proteína (\%)} = \frac{V \times N \times f \times 0,014}{m} \times 100$$

Sendo que:

V = volume da solução de ácido clorídrico 0,1 N gasto na titulação

N = normalidade teórica da solução de ácido clorídrico 0,1 N

f = fator de correção da solução de ácido clorídrico 0,1 N;

m = massa da amostra

#### 4.5.4.7. Acidez titulável e pH

Para a determinação da acidez titulável dos queijos, foram transferidos 10 g da amostra para um béquer, seguido de acréscimo de 50 mL de água a 40 °C isenta de gás carbônico. O conteúdo foi agitado com bastão de vidro até dissolução. Em seguida, transferiu-se a mistura para balão volumétrico de 100 mL, e seu volume foi completado com água destilada isenta de gás carbônico. Uma alíquota de 50 mL desse conteúdo foi transferida para um béquer, no qual se acrescentaram dez gotas de solução alcoólica de fenolftaleína a 1 %, seguido de titulação com solução de hidróxido de sódio 0,1 N até leve coloração rósea persistente por aproximadamente trinta segundos. A acidez titulável foi determinada pela seguinte fórmula (Merck, 1993):

$$\text{Ácido láctico (\%)} = \frac{V \times f \times 0,9}{m} \times 100$$

Sendo que:

V = volume da solução de hidróxido de sódio 0,1 N gasto na titulação

F = fator de correção da solução de hidróxido de sódio 0,1 N

0,9 = fator de conversão do ácido láctico

m = massa da amostra

O pH dos queijos foi determinado a partir da transferência de 10 g das amostras e 50 mL de água destilada isenta de gás carbono para um béquer. Em seguida, o conteúdo foi misturado com bastão de vidro até obtenção de uma pasta homogênea. Na sequência, o eletrodo de pHmetro (Gehaka PG1800, São Paulo, Brasil) previamente calibrado foi submerso e mantido até estabilidade da resposta (Helrich, 1990).

#### 4.6. Delineamento experimental e análise estatística

O delineamento experimental foi inteiramente ao acaso com arranjo fatorial do tipo 2 x 4 x 5 (duas épocas do ano – seca e chuva; quatro queijarias; e cinco períodos de maturação - um, sete, 14, 22 e 60 dias).

Para avaliação da normalidade, ou seja, determinar se os dados seguem uma distribuição gaussiana, as variáveis foram submetidas ao teste de Shapiro-Wilk. A homocedasticidade, ou seja, a avaliação das variâncias dos erros, foi determinada pelo teste de Bartlett.

A comparação dos resultados das análises de água, leite e soro-fermento entre as duas épocas do ano foi feita pelo teste t (dados paramétricos) e pelo teste de Mann-Whitney (dados não paramétricos), todos com um nível de significância de 5 %.

Os dados paramétricos dos queijos foram avaliados pelo teste de Sidak (entre épocas do ano) e teste de Tukey (entre períodos de maturação), com um nível de significância de 5 %. Os dados não paramétricos dos queijos foram avaliados pelo teste de Friedman (entre períodos de maturação e épocas do ano) com um nível de significância de 5 %.



As análises estatísticas foram realizadas pelo *software* Graphpad Prism 7.0. Os testes de comparação usados para cada amostra em relação aos parâmetros pesquisados estão dispostos na tabela 8 (microbiologia) e tabela 9 (físico-química).

Tabela 8. Testes de comparação aplicados sobre os resultados das análises microbiológicas de água, soro-fermento, leite cru e queijo.

Análises microbiológicas	Amostras			
	Água	Soro-fermento	Leite cru	Queijo
BAL	-	Mann-Whitney	Mann-Whitney	Friedman <sup>1</sup>
Bolores e leveduras	-	Mann-Whitney	Mann-Whitney	Friedman <sup>1</sup>
Coliformes a 30 °C	Mann-Whitney	Mann-Whitney	Mann-Whitney	Friedman <sup>1</sup>
Coliformes a 45 °C	Mann-Whitney	Mann-Whitney	Mann-Whitney	Friedman <sup>1</sup>
Contagem de células somáticas	-	-	Teste-t	-
Contagem padrão em placas	-	-	Mann-Whitney	-
Mesófilos aeróbios	Mann-Whitney	-	-	-
<i>Staphylococcus</i> spp.	-	Mann-Whitney	Mann-Whitney	Friedman <sup>1</sup>
<i>Staphylococcus</i> coagulase positivo	-	Mann-Whitney	Mann-Whitney	Friedman <sup>1</sup>

<sup>1</sup>Comparação entre épocas do ano e entre períodos de maturação

Tabela 9. Testes de comparação aplicados sobre os resultados das análises físico-químicas de água, soro-fermento, leite cru e queijo.

Análises físico-químicas	Amostras			
	Água	Soro-fermento	Leite cru	Queijo
Acidez titulável	Teste-t	Teste-t	Teste-t	Sidak <sup>1</sup> /Tukey <sup>2</sup>
Alcalinidade	Teste-t	-	-	-
Cloretos	Teste-t	Teste-t	-	Sidak <sup>1</sup> /Tukey <sup>2</sup>
Cloro residual	Teste-t	-	-	-
Dureza	Teste-t	-	-	-
Extrato seco desengordurado	-	-	Teste-t	-
Extrato seco total	-	-	Teste-t	Sidak <sup>1</sup> /Tukey <sup>2</sup>
Gordura	-	-	Teste-t	Sidak <sup>1</sup> /Tukey <sup>2</sup>
Gordura no extrato seco	-	-	-	Sidak <sup>1</sup> /Tukey <sup>2</sup>
Lactose	-	-	Teste-t	-
Proteína	-	-	Teste-t	Sidak <sup>1</sup> /Tukey <sup>2</sup>
pH	Teste-t	Teste-t	Teste-t	Sidak <sup>1</sup> /Tukey <sup>2</sup>
Resíduo mineral fixo	-	-	-	Sidak <sup>1</sup> /Tukey <sup>2</sup>
Umidade	-	-	-	Sidak <sup>1</sup> /Tukey <sup>2</sup>

<sup>1</sup>Comparação entre épocas do ano; <sup>2</sup>Comparação entre períodos de maturação

#### 4.7. Extensão rural

Após conclusão das análises microbiológicas e físico-químicas de água, soro-fermento, leite cru, *swabs* e queijos, foram agendadas reuniões com os produtores participantes do estudo para apresentação e discussão dos resultados gerais e individuais obtidos.

Também foi organizado um dia de campo para realização de atividades que abordavam os prováveis pontos que dificultaram a adequação dos queijos à legislação nos períodos de maturação anteriores a 22 dias.

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1. Variações de temperatura e umidade nas queijarias ao longo da maturação

O registro das temperaturas ambientais e das umidades relativas do ar de cada queijaria durante a maturação dos queijos no período seco está disposto no ANEXO III. Cabe ressaltar que em todas as queijarias que participaram do estudo, os recintos destinados à maturação dos queijos não dispunham de controle da temperatura ambiental e da umidade relativa do ar. A média das temperaturas e umidade das queijarias para cada um desses parâmetros, ao longo dos 60 dias de maturação no período seco (duas medições por dia), estão representados na figura 3 e 4, respectivamente.



Figura 3. Temperatura ambiental média de câmara de maturação de quatro queijarias registrada ao longo de 60 dias de maturação de queijo Minas artesanal da mesorregião do Campo das Vertentes no período seco do ano de 2021

A temperatura média geral ao longo dos 60 dias de observação foi de 17,02 °C. Ao considerar apenas as medições realizadas no período diurno, a temperatura média foi de 17,21 °C. Conforme esperado, no período noturno a temperatura média foi menor: 16,84 °C. A temperatura individual mais alta entre as queijarias foi 24,3 °C, registrada na mensuração diurna do 55º dia de maturação. A mais baixa foi 9,1 °C, registrada na mensuração noturna do 18º dia de maturação (ANEXO III).

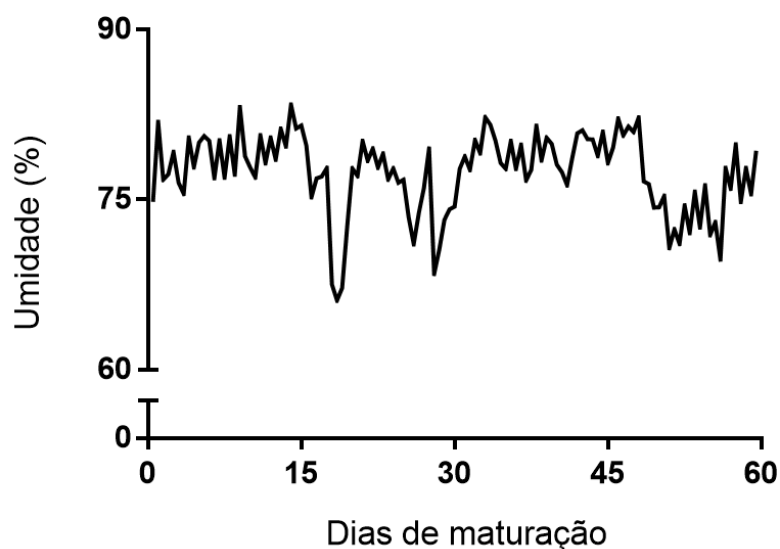


Figura 4. Umidade relativa do ar média de câmara de maturação de quatro queijarias registrada ao longo de 60 dias de maturação de queijo Minas artesanal da mesorregião do Campo das Vertentes no período seco do ano de 2021

A umidade relativa do ar média em todo período de avaliação foi de 77,37 %. A média de umidade das medições diurnas e noturnas foi exatamente o mesmo valor observado na média geral: 77,37 %. Esse resultado destaca que a umidade do ar, diferentemente da temperatura ambiental, está menos sujeita à variação em função do período do dia. A maior umidade individual foi registrada na mensuração diurna do 46º dia de maturação: 97,9 %. A menor umidade, 40,1 %, foi registrada na mensuração diurna do 18º dia de maturação (ANEXO III).

Em geral, a umidade relativa do ar média apresentou uma tendência de oscilar dentro de um intervalo de 70 a 80 %. Por outro lado, a temperatura ambiental média apresentou aumento a partir do último terço da maturação (agosto de 2021).

## 5.2. Qualidade microbiológica e físico-química da água

Os resultados das análises microbiológicas da água usada nas queijarias podem ser verificados na tabela 10.

Tabela 10. Medianas de parâmetros microbiológicos da água de queijarias (n =4) registradas para produção de queijo Minas artesanal da região do Campo das Vertentes – MG, durante as estações de seca e chuva

Análises	Estação	Medianas	Mínimo	Máximo	Padrão
Coliformes a 30 °C (NMP/100 mL)	Chuva	< 0,9 <sup>A</sup>	< 0,9	< 0,9	Ausência
	Seca	< 0,9 <sup>A</sup>	< 0,9	9,2	
Coliformes a 45 °C (NMP/100 mL)	Chuva	< 0,9 <sup>A</sup>	< 0,9	< 0,9	Ausência
	Seca	< 0,9 <sup>A</sup>	< 0,9	0,94	
Mesófilos aeróbios (UFC/mL)	Chuva	< 1,0 <sup>A</sup>	< 1,0	< 1,0	≤ 5 x 10 <sup>2</sup>
	Seca	< 1,0 <sup>A</sup>	< 1,0	1,8 x 10 <sup>3</sup>	

<sup>A</sup>Medianas com sobrescritos iguais não diferem significativamente na coluna pelo teste de Mann-Whitney (P < 0,05).

Em geral, as medianas dos indicadores microbiológicos analisados nas amostras de água coletadas no período chuvoso e seco apresentaram níveis abaixo do limite de detecção das técnicas. Esses resultados condizem com os padrões estabelecidos pela legislação (Minas Gerais, 2018d; Brasil,

2021), abordados anteriormente na tabela 3. Resultados opostos foram encontrados no trabalho de Castro *et al.* (2016), ao analisar a água de queijarias não registradas pelo IMA, localizadas na mesorregião do Campo das Vertentes. A detecção de coliformes e mesófilos aeróbios por esses autores destacam que algumas medidas exigidas no processo de registro das queijarias, relacionadas à captação, armazenagem e cloração da água, são eficazes para manter limites aceitáveis de tais micro-organismos (Minas Gerais, 2002c).

Cabe ressaltar que Pereira *et al.* (2014) observaram que a água de algumas queijarias artesanais da região do Campo das Vertentes, mesmo quando submetida à filtração e cloração, apresentavam níveis detectáveis de coliformes a 30 °C e 45 °C, sendo essa uma potencial e constante fonte de contaminação e recontaminação aos queijos. Dessa forma, outras condições relacionadas à estocagem e à integridade de tubulações podem interferir no aspecto microbiológico da água.

Castro *et al.* (2016) também observaram que o período chuvoso representa a estação climática do ano que contribui para a contaminação da água por mesófilos aeróbios, atribuindo esse achado às altas temperatura e umidade ambientais. Essa informação valoriza ainda mais os resultados obtidos, uma vez que as amostras de água das queijarias apresentaram níveis indetectáveis de indicadores microbiológicos justamente no período do ano de maior desafio. Ao considerar os resultados individuais, em duas queijarias foi detectada a presença de coliformes e de mesófilos aeróbios na água coletada durante a estação seca.

Os resultados microbiológicos encontrados na água das queijarias podem estar relacionados tanto à qualidade da água na fonte em que é extraída, bem como ao tratamento dessa pela cloração, como verificado na tabela 11, que demonstra os resultados das análises físico-químicas.

Tabela 11. Médias e coeficientes de variação (CV) de parâmetros físico-químicos da água de queijarias registradas (n=4) para produção de queijo Minas artesanal da região do Campo das Vertentes – MG, durante as estações de seca e chuva

Análises	Estação	Média	CV(%)	Mínimo	Máximo	Padrão
Acidez (mg/L)	Chuva	45,98 <sup>A</sup>	39,38	29,66	76,60	-
	Seca	68,75 <sup>A</sup>	28,71	36,74	86,24	
Alcalinidade (mg/L)	Chuva	25,75 <sup>A</sup>	41,0	10,05	36,85	-
	Seca	24,66 <sup>A</sup>	37,79	8,75	31,80	
Cloretos (mg/L)	Chuva	17,62 <sup>A</sup>	91,55	5,44	45,24	≤ 250
	Seca	22,04 <sup>A</sup>	101,51	6,22	60,67	
Cloro residual (mg/L)	Chuva	1,85 <sup>A</sup>	65,01	0,18	3,05	0,2 – 2,0
	Seca	0,59 <sup>A</sup>	111,16	0	1,60	
Dureza (mg/L)	Chuva	25,08 <sup>A</sup>	11,47	20,40	28,10	≤ 500
	Seca	32,43 <sup>A</sup>	15,65	25,7	39	
pH	Chuva	6,34 <sup>A</sup>	6,02	5,72	6,74	6,0 – 9,5
	Seca	5,94 <sup>A</sup>	1,49	5,85	6,06	

<sup>A</sup>Médias com sobrescritos iguais não diferem significativamente na coluna pelo teste t (P < 0,05).

Percebe-se que, independentemente da época do ano, a média geral das amostras para a concentração de cloro residual se encontra dentro do intervalo de valores preconizado pelas legislações (Minas Gerais, 2018d; Brasil, 2021). Esse resultado pode ser associado à qualidade microbiológica encontrada nessas amostras, uma vez que o cloro é um composto capaz de exercer atividade desinfetante por meio de mecanismos oxidantes (Ofori *et al.*, 2017).

Entretanto, ao avaliar isoladamente a concentração de cloro residual da água de cada queijaria, observa-se que em algumas delas a concentração estava abaixo do recomendado ou sequer foi

detectado níveis residuais de cloro (coluna “Mínimo” da tabela 11). Tal achado se associou diretamente à presença de coliformes e mesófilos aeróbios, detectados na água dessas queijarias durante o período seco. Por outro lado, a água coletada de uma queijaria durante a estação chuvosa apresentou um nível de cloro acima do estabelecido pelo Ministério da Saúde, conforme pode ser observado na coluna “Máximo” da tabela 11 (Minas Gerais, 2011b). Ofori *et al.* (2017) observaram que o excesso de cloro na água pode reagir com compostos orgânicos, dando origem a moléculas com atividade carcinogênica, como ácido haloacético, haloacetônitrilos e trihalometanos. Além disso, o excesso de cloro pode ser prejudicial à população de microorganismos desejáveis (BAL) e, conseqüentemente, alterar as características sensoriais dos queijos. Por esses motivos, é preconizado que a concentração de cloro residual na água respeite o intervalo delimitado pela legislação.

Os valores médios para pH, cloretos e dureza da água estavam de acordo com os limites estabelecidos pelas legislações no período chuvoso (Minas Gerias, 2018d; Brasil, 2021). Entretanto, no período de seca a média geral do pH da água ficou abaixo do recomendado. Corrosões em equipamentos e comprometimento da eficácia dos processos de desinfecção podem ocorrer quando a água apresenta um pH abaixo do limite mínimo preconizado. O desenvolvimento de acidez na água tem relação direta com a presença de gás carbônico em sua composição, que ao se dissociar em ambiente aquoso, leva ao acúmulo de ácido carbônico (Hirshberg e Gerber, 2016). Nesse sentido, a análise da acidez da água sugere que a presença desse composto contribui para que o pH da água se situe em uma faixa ácida.

Apesar da presença de gás carbônico nas amostras de água, em contrapartida, o pH pode ter sido influenciado, por efeito tampão, pelos compostos alcalinos. Os principais compostos relacionados com a alcalinidade da água são os carbonatos e bicarbonato, oriundos da reação do gás carbônico com o carbonato de cálcio oriundo do solo (Nan *et al.*, 2016).

A presença do carbonato de cálcio também se relaciona com a dureza da água, uma vez que essa propriedade é determinada pela presença de cátions bivalentes dissolvidos no meio aquoso, como o íon cálcio ( $\text{Ca}^{+2}$ ) e íon magnésio ( $\text{Mg}^{+2}$ ). Altas concentrações destes íons na presença de detergentes alcalinos podem se relacionar ao desenvolvimento de incrustações em superfícies, comprometendo a integridade de equipamentos e predispondo à formação de biofilmes microbianos (Barloková *et al.*, 2017). Nesse sentido, todas as amostras analisadas apresentaram dureza abaixo do limite máximo estabelecido, o que reduz a chance de formação das incrustações.

Da mesma forma, todas as amostras de água analisadas também apresentaram níveis de cloretos abaixo do nível máximo recomendado. Concentrações de íons cloretos acima do estabelecido pela legislação podem alterar as características da água, tornando-a mais salina e com capacidade de corrosão de superfícies metálicas. O cloro dissociado pode se originar de sais naturalmente presentes na natureza, como os cloretos de sódio, de potássio e de cálcio. Além disso, a presença desse íon pode ser indicativa da presença de resíduos de efluentes domésticos, industriais e/ou agrícolas na água (Mahapatra *et al.*, 2012).

Apenas os resultados para os parâmetros cloretos e a dureza da água estavam em conformidade com as legislações (Minas Gerias, 2018d; Brasil, 2021) em todas as queijarias, independentemente da época do ano. As principais diferenças entre os parâmetros de avaliação da qualidade da água das queijarias podem ter sido influenciadas pela origem desse insumo, uma vez que metade das queijarias obtinha água de poço semiartesiano, enquanto o restante a captava

de minas. O percentual de amostras de água em conformidade com os parâmetros estabelecidos pelo Ministério da Saúde (Brasil, 2021) está disposto na tabela 12.

Tabela 12. Percentual de queijarias registradas (n=4) de produção de queijo Minas artesanal da região do Campo das Vertentes – MG, apresentando qualidade físico-química e microbiológica de água em acordo com a Portaria GM/MS nº 888, durante as estações de seca e chuva

Parâmetro	Estação	
	Chuva	Seca
Coliformes a 30 °C (NMP/100 mL)	100 %	75 %
Coliformes a 45 °C (NMP/100 mL)	100 %	75 %
Contagem padrão em placas (UFC/mL)	100 %	75 %
Cloretos (mg/L)	100 %	100 %
Cloro residual (mg/L)	25 %	50 %
Dureza (mg/L)	100 %	100 %
pH	75 %	50 %

Embora a média geral do teor de cloro residual tenha se situado dentro da faixa estabelecida pela legislação, pode ser observado que a maior parte das amostras não estava em conformidade. Em duas amostras de água coletadas no período seco não foi detectada a presença de cloro residual. Esse resultado também está em discordância com a legislação estadual, que determina a obrigatoriedade do processo de cloração da água das queijarias e o controle periódico de sua concentração (Minas Gerais, 2020b). Em uma dessas amostras, a ausência de cloro se refletiu na presença de indicadores higiênico-sanitários (coliformes e mesófilos aeróbios). Esse resultado contrasta com o que foi discutido por Castro *et al.* (2016), ao afirmarem que o período chuvoso representa a estação climática de maior desafio microbiológico à água. Possivelmente a sensação de maior segurança em virtude das condições ambientais do período seco possa ter influenciado os produtores a negligenciar o adequado tratamento da água. Nesse sentido, no período chuvoso duas queijarias apresentaram níveis de cloro residual acima do recomendando. Provavelmente, o excesso de zelo em razão do maior desafio microbiológico que a estação chuvosa proporciona pode ter ocasionado esse achado.

O pH também foi um parâmetro que apresentou um considerável número de amostras com valor abaixo do limite mínimo determinado. Conforme discutido, o pH em uma faixa ácida pode causar a formação de corrosões em equipamentos e superfícies relacionadas à produção de queijos e ainda comprometer a eficácia de produtos desinfetantes (Yusof *et al.*, 2019).

### 5.3. Qualidade microbiológica e físico-química de soro-fermento

Os resultados das análises microbiológicas do soro-fermento usado na produção do QMA do Campo das Vertentes podem ser observados na tabela 13.

Tabela 13. Medianas de parâmetros microbiológicos do soro-fermento usado em queijarias registradas (n=4) para produção de queijo Minas artesanal da região do Campo das Vertentes – MG, durante as estações de seca e chuva

Análises	Estação	Medianas	Mínimo	Máximo
Bactérias ácido-láticas (UFC/mL)	Chuva	1,7 x 10 <sup>7</sup> <sup>A</sup>	2,1 x 10 <sup>6</sup>	8 x 10 <sup>7</sup>
	Seca	3,8 x 10 <sup>7</sup> <sup>A</sup>	< 1 x 10 <sup>4</sup>	9,7 x 10 <sup>7</sup>
Bolores e leveduras (UFC/mL)	Chuva	1,3 x 10 <sup>6</sup> <sup>A</sup>	< 1 x 10 <sup>4</sup>	> 1,5 x 10 <sup>7</sup>
	Seca	3,5 x 10 <sup>7</sup> <sup>A</sup>	1,6 x 10 <sup>5</sup>	1,7 x 10 <sup>8</sup>
Coliformes a 30 °C (NMP/mL)	Chuva	1,6 x 10 <sup>3</sup> <sup>A</sup>	< 3 x 10 <sup>1</sup>	> 1,1 x 10 <sup>4</sup>
	Seca	7,8 x 10 <sup>3</sup> <sup>A</sup>	2,1 x 10 <sup>3</sup>	> 1,1 x 10 <sup>4</sup>
Coliformes a 45 °C (NMP/mL)	Chuva	8,4 x 10 <sup>2</sup> <sup>A</sup>	< 3 x 10 <sup>1</sup>	> 1,1 x 10 <sup>4</sup>
	Seca	< 3 x 10 <sup>1</sup> <sup>A</sup>	< 3 x 10 <sup>1</sup>	< 3 x 10 <sup>1</sup>
<i>Staphylococcus</i> spp. (UFC/mL)	Chuva	4,6 x 10 <sup>5</sup> <sup>A</sup>	< 1 x 10 <sup>4</sup>	7,7 x 10 <sup>5</sup>
	Seca	1,2 x 10 <sup>6</sup> <sup>A</sup>	< 1 x 10 <sup>3</sup>	4,1 x 10 <sup>6</sup>
<i>Staphylococcus</i> coagulase positivo (UCF/mL)	Chuva	< 1 x 10 <sup>4</sup> <sup>A</sup>	< 1 x 10 <sup>4</sup>	2,6 x 10 <sup>5</sup>
	Seca	< 1 x 10 <sup>3</sup> <sup>B</sup>	< 1 x 10 <sup>3</sup>	< 1 x 10 <sup>3</sup>
<i>Salmonella</i> spp. (presença/25 mL)	Chuva	Ausência	-	-
	Seca	Ausência	-	-

<sup>A-B</sup>Medianas com sobrescritos distintos diferem significativamente na coluna pelo teste de Mann-Whitney (P < 0,05).

Embora não existam padrões estabelecidos em legislações ou sugeridos por estudos para a contagem de micro-organismos no soro-fermento, em termos de valores absolutos foram observadas altas contagens de BAL, bolores e leveduras, coliformes a 30 °C, *Staphylococcus* spp. e *Staphylococcus* coagulase positivo nas duas estações do ano. A principal diferença observada nos resultados dos parâmetros microbiológicos causada pelo efeito das estações (P < 0,05) foi na análise de *Staphylococcus* coagulase positivo, uma vez que esse micro-organismo apresentou contagens abaixo do limite de detecção da técnica nas amostras do período seco. Também não foi detectada a presença de coliformes a 45 °C na menor diluição avaliada das amostras de soro-fermento coletadas no período seco. Entretanto, isso não tenha se traduziu em uma diferença estatística (P > 0,05) entre as diferentes estações do ano.

Os soro-fermentos analisados se apresentaram como um potencial perigo do ponto de vista microbiológico para a produção de queijos. A adição desse insumo ao leite leva à inoculação de micro-organismos de importância higiênico-sanitária, como bolores e leveduras, coliformes e *Staphylococcus* coagulase positivo. Por outro lado, BAL se apresentaram como a população mais dominante nesse meio, dentre os micro-organismos pesquisados, segundo as técnicas microbiológicas utilizadas. Conforme abordado anteriormente, esses micro-organismos são amplamente desejáveis e necessários para a produção de queijos. A propriedade fermentativa atribuída a esse insumo se deve a capacidade das BAL em realizarem a fermentação láctica (Oliveira *et al.*, 2018).

No trabalho de Oliveira (2014) também foi observado um predomínio de BAL no soro-fermento de queijarias da mesorregião do Campo das Vertentes. Na época da chuva, a autora também observou contagens desses micro-organismos na mesma faixa logarítmica encontrada no presente estudo. O mesmo perfil foi observado também em soro-fermentos oriundos de queijarias não certificadas dessa região para as duas épocas do ano (Castro *et al.*, 2016).

Em ambos os estudos supracitados, bolores e leveduras também representaram o segundo grupo microbiano predominante, com contagens variando de 5,1 x 10<sup>5</sup> a 1,1 x 10<sup>6</sup> UFC/mL no período chuvoso e 2,3 x 10<sup>5</sup> a 9,6 x 10<sup>5</sup> UFC/mL no período seco (Oliveira, 2014; Castro *et al.*, 2016). Embora alguns exemplares fúngicos possam se relacionar às micoses, micotoxicoses e deterioração de produtos, outros são fundamentais na etapa de proteólise que contribui para o controle do pH da massa, além de produzir compostos capazes de promover a formação do aroma,

da textura e do sabor dos queijos. Nesse sentido, o soro-fermento pode se apresentar como potencial fonte de micro-organismos de importância sensorial ao QMA (Copetti, 2019).

Castro *et al.* (2016) também encontraram contagens de coliformes a 30 °C e 45 °C na mesma faixa logarítmica encontrada neste estudo. Entretanto, Oliveira (2014) relatou contagens inferiores para coliformes no período chuvoso de  $2,5 \times 10^2$  e  $2,3 \times 10^2$  NMP/mL para coliformes a 30 °C e 45 °C, respectivamente. Assim como observado por Oliveira (2014), a diferença entre as contagens de coliformes a 30 °C e a 45 °C foi baixa. Esse achado sugere a contaminação do soro-fermento por partículas fecais ou falhas sanitárias durante a produção dos queijos e destaca o perigo sanitário que esses micro-organismos podem proporcionar.

No estudo de Oliveira (2014) a contagem de *Staphylococcus* coagulase positivo apresentou a mesma base logarítmica encontrada no soro-fermento analisados no presente estudo. Por outro lado, no soro-fermento oriundo de queijarias não registradas da mesorregião do Campo das Vertentes essa contagem foi maior e atingiu o valor de  $2,4 \times 10^5$  UFC/mL no período chuvoso (Castro *et al.*, 2016). Esse achado tem uma grande importância sanitária, uma vez que adição de soro-fermento à massa de queijo pode carrear tanto micro-organismos potencialmente produtores de enterotoxinas como também inocular toxinas pré-formadas ao produto. Rajkovic *et al.* (2020) observaram que *S. aureus* são capazes de produzir cerca de 0,05 ng/mL de enterotoxina, quantidade suficiente para provocar intoxicação, quando atingem a concentração de  $10^5$  UFC/mL em produtos lácteos. Percebe-se que a concentração de *Staphylococcus* coagulase positivo registrada no soro-fermento de algumas queijarias analisadas (coluna “Máximo” da tabela 13) apresenta valor próximo ao determinado por estes autores.

A ausência de *Salmonella* spp. em soro-fermentos oriundos da mesorregião do Campo das Vertentes também foi verificada em estudos realizados na região (Oliveira, 2014; Castro *et al.*, 2016). Por ser um micro-organismo pouco competitivo, *Salmonella* spp. encontra dificuldades em se estabelecer no ambiente do soro-fermento, uma vez que esse possui características desafiadoras. Além da competição com outros grupos microbianos presentes nesse meio, o soro-fermento apresenta outros fatores que não favorecem o estabelecimento de populações de *Salmonella* spp., como o ambiente ácido e um considerável teor de cloreto de sódio (Acurcio *et al.*, 2017; Sant’anna *et al.*, 2017), como pode ser observado na tabela 14, que demonstra os resultados das análises físico-químicas realizadas no soros-fermentos.

Tabela 14. Médias e coeficientes de variação (CV) de parâmetros físico-químicos do soro-fermento usado em queijarias registradas (n=4) para produção de queijo Minas artesanal da região do Campo das Vertentes – MG, durante as estações de seca e chuva

Análises	Estação	Média	CV(%)	Mínimo	Máximo
Acidez (g/100 g)	Chuva	6,18 <sup>A</sup>	35,51	3,13	9,27
	Seca	3,55 <sup>A</sup>	58,87	1,43	5,87
Cloretos (g/100 g)	Chuva	3,60 <sup>A</sup>	39,92	1,23	5,09
	Seca	5,90 <sup>A</sup>	18,51	4,35	7,09
pH	Chuva	5,00 <sup>A</sup>	1,11	4,91	5,02
	Seca	5,72 <sup>B</sup>	7,45	5,16	6,19

<sup>A,B</sup>Médias com sobrescritos distintos diferem significativamente na coluna pelo teste t (P < 0,05).

O caráter ácido do soro-fermento foi evidenciado pela alta acidez titulável e pH obtidos nas análises. Por se originar a partir do soro lácteo, o soro-fermento é ricamente composto por lactose. Ao ser mantido à temperatura ambiente durante sua coleta até sua utilização do dia seguinte, a



lactose é fermentada por micro-organismos, como BAL e coliformes. A partir da fermentação da lactose, há a formação de ácidos orgânicos que determinam a característica ácida desse composto.

O soro-fermento coletado na época das chuvas apresentou uma acidez titulável mais acentuada ( $P < 0,05$ ). A ocorrência de um soro-fermento mais ácido no período chuvoso foi um achado esperado. Conforme descrito anteriormente, o soro-fermento é coletado após a enformagem e salga da massa dos queijos e permanece em temperatura ambiente até ser usado na produção de queijos do dia subsequente. Portanto, no período das chuvas o maior grau de contaminação ambiental, associado à temperatura ambiental mais elevada, favorece o desenvolvimento e o metabolismo e a multiplicação de micro-organismos no soro-fermento, incluindo as bactérias fermentadoras, com incremento na quantidade de ácido produzido em relação a estação seca.

Conforme abordado previamente, embora não existam padrões oficiais, muitos produtores de QMA afirmam que soro-fermentos com acidez variando de 0,75 a 1 g/100 g de ácido láctico (ou 75 a 100 °D) são considerados os ideais para serem adicionados à massa do queijo. Considerando esse intervalo, apenas uma amostra de soro-fermento coletada no período chuvoso atendeu tal requisito.

O teor de cloretos no soro-fermento foi menor que o encontrado em outros estudos. Figueiredo (2018) observou que o soro-fermento da região da Serra do Salitre apresentava concentração de cloretos de 7,03 g/100 g, sendo esse valor quase o dobro do que o encontrado nas queijarias da mesorregião do Campo das Vertentes na época chuvosa. A presença desse composto no soro-fermento é influenciada diretamente pela etapa de salga dos queijos. Após a salga, parte do cloreto de sódio que se solubiliza na umidade do queijo é eliminada junto ao soro durante o processo de sinérese.

A diferença entre o teor de cloretos do soro-fermento de distintas queijarias é um fenômeno esperado. Dado o caráter artesanal da produção do QMA, não existe uma padronização de procedimentos relacionados à salga do produto, bem como da concentração de cloreto de sódio que é utilizada. Esse perfil pode contribuir para a variação do teor de cloretos entre os diferentes soro-fermentos.

Apesar da condição ácida e da presença de cloreto de sódio, esses não se apresentaram como fatores limitantes à viabilidade de alguns micro-organismos, como *S. aureus* e coliformes. Elahi e Fujikawa (2019) observaram que, mesmo em ambientes com teor de 5 % de cloreto de sódio e pH de 4,5, algumas amostras de *S. aureus* eram capazes de produzir enterotoxinas. Da mesma forma, Huang *et al.* (2014) destacaram a tolerância que BAL podem apresentar em ambientes com tais características, dado ao caráter halofílico desse grupo bacteriano. Embora demonstre uma maior susceptibilidade a meios ácidos e com alto teor de cloretos, coliformes também podem tolerar essas condições e serem detectados em contagens relevantes do ponto de vista higiênico-sanitário (Wusimanjiang *et al.*, 2019).

Diante dessas informações, é possível concluir que, para se buscar melhorar a qualidade do soro-fermento, deve-se ter atenção ao manejo sanitário do rebanho (controle de mastites), à higiene de ordenha (higienização de equipamentos e das mãos dos ordenhadores) e às boas práticas de fabricação dos queijos (higienização de equipamentos e das mãos dos manipuladores, uso de luvas e máscara e detecção de portadores assintomáticos).

#### 5.4. Qualidade microbiológica e físico-química de leite cru

Os resultados das análises microbiológicas de leite cru encontram-se na tabela 15.

Tabela 15. Médias e medianas de parâmetros microbiológicos e contagem de células somáticas do leite cru usado em queijarias registradas (n=4) para produção de queijo Minas artesanal da região do Campo das Vertentes – MG, durante as estações de seca e chuva

Análises	Estação	Resultados	Mínimo	Máximo	Padrão
Bactérias ácido-lácticas (UFC/mL) <sup>2</sup>	Chuva	1,5 x 10 <sup>4</sup> <sup>A</sup>	< 1 x 10 <sup>4</sup>	3,8 x 10 <sup>6</sup>	-
	Seca	< 1 x 10 <sup>4</sup> <sup>A</sup>	< 1 x 10 <sup>4</sup>	< 1 x 10 <sup>4</sup>	
Bolors e leveduras (UFC/mL) <sup>2</sup>	Chuva	2,5 x 10 <sup>4</sup> <sup>A</sup>	< 1 x 10 <sup>4</sup>	4 x 10 <sup>4</sup>	-
	Seca	9 x 10 <sup>4</sup> <sup>A</sup>	4 x 10 <sup>4</sup>	3,2 x 10 <sup>5</sup>	
Coliformes a 30 °C (NMP/mL) <sup>2</sup>	Chuva	7,8 x 10 <sup>3</sup> <sup>A</sup>	< 3 x 10 <sup>1</sup>	> 1,1 x 10 <sup>4</sup>	-
	Seca	2,9 x 10 <sup>2</sup> <sup>A</sup>	3,6 x 10 <sup>1</sup>	> 1,1 x 10 <sup>4</sup>	
Coliformes a 45 °C (NMP/mL) <sup>2</sup>	Chuva	< 3 x 10 <sup>1</sup> <sup>A</sup>	< 3 x 10 <sup>1</sup>	< 3 x 10 <sup>1</sup>	1 x 10 <sup>2</sup>
	Seca	< 3 x 10 <sup>1</sup> <sup>A</sup>	< 3 x 10 <sup>1</sup>	< 3 x 10 <sup>1</sup>	
Contagem padrão em placas (UFC/mL) <sup>1</sup>	Chuva	1,7 x 10 <sup>5</sup> <sup>A</sup>	8 x 10 <sup>3</sup>	3,9 x 10 <sup>5</sup>	1 x 10 <sup>5</sup>
	Seca	1,1 x 10 <sup>4</sup> <sup>A</sup>	5 x 10 <sup>3</sup>	1,8 x 10 <sup>4</sup>	
<i>Staphylococcus</i> spp. (UFC/mL) <sup>2</sup>	Chuva	< 1 x 10 <sup>4</sup> <sup>A</sup>	< 1 x 10 <sup>4</sup>	< 1 x 10 <sup>4</sup>	-
	Seca	2,7 x 10 <sup>3</sup> <sup>B</sup>	2,4 x 10 <sup>3</sup>	5,1 x 10 <sup>3</sup>	
<i>Staphylococcus</i> coagulase positivo (UCF/mL) <sup>2</sup>	Chuva	< 1 x 10 <sup>4</sup> <sup>A</sup>	< 1 x 10 <sup>4</sup>	< 1 x 10 <sup>4</sup>	1 x 10 <sup>2</sup>
	Seca	3,1 x 10 <sup>2</sup> <sup>B</sup>	< 1 x 10 <sup>2</sup>	5,1 x 10 <sup>3</sup>	
<i>Salmonella</i> spp. (presença/25 mL)	Chuva	Ausência	-	-	Ausência
	Seca	Ausência	-	-	
Inibidores de crescimento microbiano	Chuva	Ausência	-	-	Ausência
	Seca	Ausência	-	-	
Contagem de células somáticas (céls/mL) <sup>1</sup>	Chuva	1,9 x 10 <sup>5</sup> <sup>A</sup>	9,6 x 10 <sup>4</sup>	2,4 x 10 <sup>5</sup>	4 x 10 <sup>5</sup>
	Seca	2,1 x 10 <sup>5</sup> <sup>A</sup>	5,6 x 10 <sup>4</sup>	2,9 x 10 <sup>5</sup>	

<sup>A</sup>Médias com sobrescritos distintos diferem significativamente na coluna pelo teste t (P < 0,05)<sup>1</sup>.

<sup>A-B</sup>Medianas com sobrescritos distintos diferem significativamente na coluna pelo teste de Mann-Whitney (P < 0,05)<sup>2</sup>

Não foi detectada a presença de inibidores de crescimento microbiano nas amostras de leite cru, independentemente da estação do ano. Esse resultado sugere que as baixas contagens de indicadores microbianos, como BAL e coliformes a 45 °C, não se relacionam com a presença de compostos químicos de caráter inibitório no leite cru, como os resíduos de antimicrobianos.

Apesar de a análise estatística não demonstrar diferenças significativas (P > 0,05), em geral as amostras de leite cru coletadas no período chuvoso apresentaram maiores contagens microbianas. Picinin *et al.* (2019) destacaram que o clima quente e chuvoso é um grande desafio para a produção de um leite cru de qualidade microbiológica. Tal condição climática dificulta a manutenção das condições de higiene das instalações relacionadas à produção/coleta/beneficiamento do leite e torna o ambiente mais desafiador à saúde da glândula mamária dos animais.

A Lei Estadual número 14.185 de 2002 estabelece uma CPP para o leite cru destinado à produção de QMA de no máximo 1 x 10<sup>5</sup> UFC/mL (Minas Gerais, 2002c). Considerando a legislação estadual, o resultado geral continua acima do valor máximo preconizado durante o período chuvoso, enquanto a média geral durante o período seco apresentou CPP em conformidade. Ao analisar isoladamente o leite cru de cada queijaria, o número de amostras que se enquadravam na legislação foi de duas no período chuvoso, enquanto no período seco todas as amostras apresentaram CPP adequadas.

A CPP encontrada para o leite cru usado para produção de QMA da mesorregião do Campo das Vertentes se assemelhou ao observado por Oliveira (2014). A autora encontrou CPP de 4,3 x 10<sup>5</sup>

UFC/mL no período chuvoso e  $7,7 \times 10^5$  UFC/mL no período seco. Em queijarias não registradas do Campo das Vertentes, a CPP atingiu  $3,3 \times 10^6$  UFC/mL no período chuvoso e  $9,7 \times 10^5$  UFC/mL no período seco (Castro *et al.*, 2016). Tal comparação sugere que o processo de registro de queijarias contribui para que os produtores adotem medidas sanitárias que refletem na produção de um leite cru de melhor qualidade microbiológica.

A alta contagem de micro-organismos no leite cru pode ser um indicativo das condições higiênicas nas quais esse produto foi obtido. Os micro-organismos podem contaminar o leite cru a partir de fontes mal higienizadas como sujidades do úbere, mãos do ordenador, equipamento de ordenha e recipientes de coleta/armazenamento, além da água com qualidade microbiológica inadequada. Nesse sentido, é fundamental realizar o adequado manejo de ordenha para reduzir essa contaminação, bem como realizar a manutenção e a higienização criteriosa do equipamento de ordenha (Jamas *et al.*, 2018).

A condição sanitária do rebanho também é um fator que pode influenciar a contaminação do leite cru por micro-organismos. Em casos de infecções intramamárias, pode ocorrer a eliminação de micro-organismos pelo leite durante a ordenha, contribuindo para o aumento da CPP. Entretanto, observou-se que as médias de CCS foram inferiores ao estabelecido pelas legislações supracitadas. Além do resultado geral, todas as amostras analisadas, independentemente da estação climática, apresentaram valores inferiores ao preconizado (Minas Gerais, 2002c; Brasil, 2018).

Por serem amostras de leite cru obtidas de queijarias registradas pelo IMA, já se esperava um maior controle sanitário de toda etapa da cadeia produtiva. Produtores registrados devem seguir protocolos de controle sanitário do rebanho e avaliação mensal da qualidade do leite. Além disso, para a produção e QMA é necessário que o leite seja beneficiado no máximo 90 minutos após sua obtenção, minimizando assim a proliferação microbiana (Minas Gerais, 2002c). Por outro lado, em queijarias não registradas do Campo das Vertentes, Castro *et al.* (2016) encontraram amostras de leite cru com CCS de aproximadamente  $5 \times 10^5$  cels./mL. Esse resultado sugere que a não obrigatoriedade da adoção de tais procedimentos, exigidos durante o processo de certificação, possa contribuir para o aumento de caso de infecções intramamárias.

A CCS é considerada um indicador de saúde da glândula mamária. Ela também se relaciona às mudanças na composição do leite que comprometem a produção queijeira. O dano no epitélio mamário e a maior permeabilidade vascular decorrente do processo inflamatório altera o processo de síntese dos componentes lácteos. Dessa forma, leites com altas CCS geralmente apresentam aumento na concentração de proteínas do soro e menores teores de caseínas e lactose. A produção de queijos a partir de leite com essas alterações apresentam aumento do tempo de coagulação, menor rendimento de produção, maior atividade proteolíticas e lipolíticas, reduzida acidez e desenvolvimento de *off-flavour* (Moradi *et al.*, 2021).

Apesar do resultado satisfatório em relação às CCS, foi observada a presença de *Staphylococcus* spp. em algumas amostras de leite cru analisadas. *Staphylococcus* spp. é um dos principais patógenos relacionados às infecções intramamárias em bovinos. Apesar de não ter sido detectado em todas as amostras, cabe ressaltar que, em alguns animais portadores, esse micro-organismo é eliminado pelo leite de forma intermitente, o que pode gerar resultados falso-negativo (Rainard *et al.*, 2018). As contagens desses micro-organismos condizem com os achados de Oliveira (2014). Mas em amostras de leite cru oriundas de queijarias não registradas da mesorregião do Campo das Vertentes foram encontradas contagens mais elevadas de *Staphylococcus* spp. e

*Staphylococcus* coagulase positivo, sendo essas concentrações  $3,9 \times 10^5$  UFC/mL e  $7,1 \times 10^3$  UFC/mL, respectivamente. A presença de *Staphylococcus* spp. e *Staphylococcus* coagulase positivo em amostras de leite cru sugerem que essa pode ser uma fonte para produção de enterotoxinas estafilocócicas pré-formadas e de micro-organismos potencialmente capazes de produzi-las (Kukhtyn *et al.*, 2017).

Todas as amostras de leite cru analisadas foram ausentes de coliformes a 45 °C, assim como observado por Oliveira (2014). Esse resultado é desejável, uma vez que, conforme abordado anteriormente, esses micro-organismos podem representar perigo sanitário (Wanjala *et al.*, 2018). Entretanto, em queijarias não certificadas no Campo das Vertentes foram observadas algumas amostras com a presença de coliformes a 45 °C acima do limite preconizado (Castro *et al.*, 2016). A não adoção dessas queijarias à procedimentos relacionados à obtenção higiênico-sanitária do leite, preconizado pela legislação aos estabelecimentos registrados, pode ter resultado nessa observação (Minas Gerais, 2002c).

Por outro lado, foi encontrada contagem de coliformes a 30 °C acima dos valores observados pelos estudos de Oliveira (2014) e Castro *et al.* (2016), independentemente da época do ano. Essas constatações sugerem que o leite cru tenha sido contaminado após sua coleta, durante a manipulação e o contato com superfícies contendo partículas ambientais. Entretanto, é pouco provável que as partículas contaminantes sejam de origem fecal (Martin *et al.*, 2016).

A ausência de *Salmonella* spp. no leite cru também foi verificada em outros estudos realizados em queijarias da região (Oliveira, 2014; Castro *et al.*, 2016). Esse achado pode ser justificado pela falta de contaminação cruzada e também pelo ambiente competitivo encontrado no leite, havendo o predomínio da população de BAL no período chuvoso.

Conforme observado na tabela 15, BAL tiveram uma contagem geral de  $1,5 \times 10^4$  UFC/mL, sendo um dos grupos microbianos mais abundante do leite cru. BAL isoladas de QMA podem exercer uma série de atividades antagônicas capazes de inibir o estabelecimento e desenvolvimento de outros micro-organismos pouco competitivos, como *Salmonella* spp. (Acurcio *et al.*, 2017; Sant'anna *et al.*, 2017).

Outros autores que avaliaram leite cru utilizado em queijarias da mesorregião do Campo das Vertentes na estação chuvosa encontraram concentração de BAL variando de  $5 \times 10^4$  UFC/mL a  $4 \times 10^6$  UFC/mL (Oliveira, 2014; Castro *et al.*, 2016). Nesse sentido, observa-se que o valor encontrado na análise do leite cru coletado no período chuvoso situava-se dentro do intervalo estabelecido pelos autores. O predomínio de BAL nesse meio é um resultado desejável, uma vez que, conforme abordado, esse grupo microbiano se relaciona a inocuidade do produto e ao estabelecimento de características sensoriais (Yoon *et al.*, 2016).

Por outro lado, amostras de leite cru coletadas no período seco apresentaram níveis indetectáveis de BAL para a menor diluição avaliada. Li *et al.* (2018) ao analisarem a microbiota de amostras de leite cru também não detectaram esses micro-organismos. Figueiredo (2018) também não detectou BAL no leite cru coletado no período seco, destinado à produção de QMA da mesorregião da Serra do Salitre. Tal achado pode representar um potencial perigo microbiológico, uma vez que uma população reduzida de BAL diminui a competição microbiana no leite, permitindo que outros micro-organismos, incluindo os patogênicos, possam se estabelecer e manter-se viáveis nesse meio (Valík *et al.*, 2018). Além disso, a presença BAL em queijos influencia diretamente na determinação das características sensoriais, devido à produção de ácido e ao metabolismo proteolítico de algumas amostras (Khattab *et al.*, 2019).

A contagem de bolores e leveduras observada encontra-se na mesma faixa logarítmica encontrada no estudo de Castro *et al.* (2016). Embora não existam padrões estabelecidos para a contagem desse grupo microbiano no leite cru, são esperadas contagens baixas desses micro-organismos ou até mesmo inexistentes, como foi observado por Oliveira (2014). A presença de bolores e leveduras no leite cru pode ser um reflexo das condições higiênicas nas quais ele foi obtido, uma vez que esses micro-organismos podem estar presentes em partículas ambientais e em superfícies mal higienizadas (Talukder *et al.*, 2019).

Os parâmetros físico-químicos do leite cru usado para produção de queijo Minas artesanal no Campo das Vertentes podem ser observados na tabela 16.

Tabela 16. Médias e coeficientes de variação (CV) de parâmetros físico-químicos do leite cru usado em queijarias registradas (n=4) para produção de queijo Minas artesanal da região do Campo das Vertentes – MG, durante as estações de seca e chuva

Análises	Estação	Média	CV(%)	Mínimo	Máximo	Padrão
Acidez (g/100 g)	Chuva	0,17 <sup>A</sup>	0,87	0,16	0,17	0,15 – 0,20
	Seca	0,15 <sup>B</sup>	6,93	0,13	0,16	
pH	Chuva	6,69 <sup>A</sup>	0,33	6,67	6,72	-
	Seca	6,58 <sup>B</sup>	0,99	6,48	6,66	
Gordura (g/100 g)	Chuva	4,14 <sup>A</sup>	6,39	3,71	4,54	≥ 3,0
	Seca	3,83 <sup>A</sup>	22,74	2,71	5,07	
Lactose (g/100 g)	Chuva	4,47 <sup>A</sup>	1,47	4,36	4,54	≥ 4,3
	Seca	4,40 <sup>A</sup>	4,30	4,10	4,59	
Proteína (g/100 g)	Chuva	3,39 <sup>A</sup>	4,45	3,20	3,54	-
	Seca	3,38 <sup>A</sup>	8,59	2,93	3,74	
Extrato seco total (g/100 g)	Chuva	12,97 <sup>A</sup>	3,34	12,36	13,47	≥ 11,5
	Seca	12,59 <sup>A</sup>	8,26	11,22	14,14	
Extrato seco desengordurado (g/100 g)	Chuva	8,83 <sup>A</sup>	2,24	8,61	8,98	≥ 8,5
	Seca	8,75 <sup>A</sup>	3,04	8,47	9,07	

<sup>A-B</sup>Médias com sobrescritos distintos diferem significativamente na coluna pelo teste t ( $P < 0,05$ ).

O teor de gordura foi o parâmetro que apresentou maior discrepância entre as amostras, fato que pode ser constatado pelo maior valor do CV entre as variáveis analisadas. A gordura é o componente lácteo cuja concentração está mais sujeita a oscilar em função de fatores relacionados aos animais (genética, individualidade, estágio fisiológico e sanidade) e ao ambiente (dieta e clima) (Tančin *et al.*, 2018). Embora a estação climática seja um desses fatores, a média geral não apresentou diferença significativa ( $P > 0,05$ ) entre os períodos do ano.

Além disso, o teor de gordura encontrado foi maior do que o observado por outros autores ao avaliarem a composição centesimal de leite cru produzido em Minas Gerais (Picinin *et al.*, 2019). Um dos fatores que pode ter influenciado nessa diferença é a tradição cultural dos produtores da mesorregião do Campo das Vertentes em utilizar gado da raça Jersey na pecuária leiteira. A raça Jersey possui uma genética que favorece o incremento lipídico na composição do leite, comparada a outras raças comumente criadas no estado, como a Holandesa e mestiças (Edwards *et al.*, 2019).

Por outro lado, a lactose foi o componente lácteo com mais baixa variação entre as amostras. A lactose se relaciona ao controle osmótico entre o leite e a corrente sanguínea na glândula mamária. Dessa forma, quanto maior a síntese de lactose, mais esse componente exerce um gradiente para a transferência de elementos do sangue para aumentar o volume do leite, mantendo sua concentração praticamente constante. Esse mecanismo explica porque a concentração de lactose no leite tende a não oscilar em função de outras variáveis, diferentemente do teor de gordura (Costa *et al.*, 2019).

O teor de proteínas do leite também pode oscilar, com menor intensidade comparada à gordura, de acordo com fatores relacionados aos animais e ambiente. Juntamente com a gordura, as proteínas representam os principais sólidos que se associam ao rendimento na produção de queijos (Murphy *et al.*, 2016; Tančin *et al.*, 2018). Apesar de a lactose também representar uma parcela considerável do extrato seco total, essa é eliminada junto ao soro e apenas uma pequena fração residual é retida na massa de queijo.

A acidez titulável média encontrada, se transformada para a escala Dornic, foi de 17 °D na época das chuvas e 15 °D no período seco. O leite cru foi estatisticamente mais ácido no período chuvoso ( $P < 0,05$ ). A adequação da acidez titulável à legislação foi um achado esperado, uma vez que o leite cru foi coletado pouco tempo após a ordenha e mantido sob refrigeração até a análise. Dessa forma, a refrigeração associada à ação dos inibidores naturais do leite (tais como lactoferrina e lisozima) minimizou a fermentação da lactose por micro-organismos, como coliformes e BAL (Calamari *et al.*, 2016).

O pH das amostras situou-se em uma faixa ácida. Esse resultado também era esperado, uma vez que o leite possui acidez natural, devida à presença de carbonatos, fosfatos, caseínas, minerais aniônicos e ácidos orgânicos; e acidez adquirida, promovida pela fermentação microbiana (Calamari *et al.*, 2016). O pH das amostras coletadas no período chuvoso foi estatisticamente maior que o pH das amostras coletadas no período seco ( $P < 0,05$ ). Embora o pH do leite cru não seja um parâmetro contemplado em legislações, McAuley *et al.* (2016) consideram que 6,7 seria um valor considerado normal. Baseado nessa informação, todas as amostras apresentaram pH próximos ao valor proposto.

O percentual de amostras de leite cru em conformidade com os parâmetros estabelecidos pela Decreto nº 42.645/2002 (Minas Gerais, 2002c) estão dispostos na tabela 17.

Tabela 17. Percentual de queijarias registradas (n=4) de produção de queijo Minas artesanal da região do Campo das Vertentes – MG, com padrões físico-químicos, microbiológicos e contagem de células somáticas de leite cru em acordo com a o Decreto nº 42.645/2002, durante as estações de seca e chuva

Parâmetro	Estação	
	Chuva	Seca
Contagem padrão em placas (UFC/mL)	100 %	100 %
Contagem de células somáticas (céls./mL)	100 %	100 %
<i>Staphylococcus</i> coagulase positivo (UFC/mL)	0 %	0 %
Coliformes a 45 °C (NMP/mL)	100 %	100 %
<i>Salmonella</i> spp. (ausência/25 g)	100 %	100 %
Gordura (g/100 g)	100 %	75 %
Acidez titulável (°D)	100 %	75 %
Lactose (g/100 g)	100 %	75 %
Extrato seco desengordurado (g/100 g)	100 %	75 %
Extrato seco total (g/100 g)	100 %	75 %
Resíduos de antimicrobianos	100 %	100 %

O único parâmetro microbiológico que não estava adequado, tanto na época das chuvas quanto na seca, foi a contagem de *Staphylococcus* coagulase positivo. Vários fatores podem estar envolvidos na contaminação do leite cru por esse micro-organismo, como animais com infecções intramamárias, presença de biofilmes em equipamentos e portadores assintomáticos envolvidos na produção leiteira (Elmonir *et al.*, 2019).

Todos os parâmetros físico-químicos do leite cru coletado no período chuvoso estavam de acordo com os valores estabelecidos pela legislação estadual (Minas Gerais, 2002c). Entretanto, no período seco uma amostra apresentou parâmetros físico-químicos em desconformidade. Provavelmente, um erro de amostragem, como a não homogeneização do leite antes da retirada de uma alíquota, pode ter determinado essa ocorrência.

### 5.5. Microbiologia dos swabs de superfícies

Os resultados das análises microbiológicas realizadas sobre os swabs coletados da superfície da bancada de produção de QMA estão dispostos na tabela 18.

Tabela 18. Contagens de micro-organismos em superfícies de bancadas de produção de queijarias registradas (n=4) para produção de queijo Minas artesanal da região do Campo das Vertentes – MG, durante as estações de seca e chuva

Análises	Estação	Queijarias				Padrão
		A	B	C	D	
Bactérias ácido-lácticas (log UFC/cm <sup>2</sup> )	Chuva	2,9	3,6	-	-	-
	Seca	2,0	4,0	3,4	-	
Coliformes a 30 °C (log NMP/cm <sup>2</sup> )	Chuva	2,6	1,2	0,6	-	1,4
	Seca	1,3	1,2	0,5	-	
Coliformes a 45 °C (log NMP/cm <sup>2</sup> )	Chuva	1,6	-	-	-	0,7
	Seca	-	-	-	-	
<i>Staphylococcus</i> spp. (log UFC/cm <sup>2</sup> )	Chuva	2,3	2,8	2,5	-	0,7
	Seca	0,9	3,1	3,9	-	
<i>Staphylococcus</i> coagulase positivo (log UCF/cm <sup>2</sup> )	Chuva	1,6	-	-	-	0,7
	Seca	0,2	-	-	-	

Valores ausentes (-) representam contagens abaixo do limite mínimo de detecção da técnica.

De acordo com os padrões sugeridos pela tabela 6 para qualidade microbiológica de superfícies relacionadas ao processamento de alimentos, as superfícies de três bancadas de produção (queijarias A, B e C) tiveram contagens acima do recomendado para *Staphylococcus* spp. nas duas estações do ano. Em uma delas (queijaria A), no período chuvoso, também foi detectada a presença de *Staphylococcus* coagulase positivo em contagem que excedia o valor preconizado (Sveum *et al.*, 1992; Galinari *et al.*, 2014).

Considerando os coliformes a 30 °C, uma queijaria (queijaria A) no período chuvoso apresentou a superfície de bancada de produção com valor de NMP/cm<sup>2</sup> acima do estabelecido. A mesma queijaria também apresentou NMP/cm<sup>2</sup> de coliformes a 45 °C excedendo o limite máximo sugerido. Por outro lado, no restante das queijarias não foi detectada a presença de coliformes a 45 °C. Em duas queijarias (queijarias B e C), os resultados de NMP/cm<sup>2</sup> de coliformes a 30 °C ficaram abaixo dos valores recomendados e em uma (queijaria D) não foram detectadas bactérias desse grupo (Sveum *et al.*, 1992; Galinari *et al.*; 2014). A presença de coliformes em superfícies é um fator que contribui para o estabelecimento de biofilmes desses micro-organismos. Campos *et al.* (2018) observaram que amostras de *E. coli* encontradas em queijos mostraram moderada capacidade de produzir biofilmes, com potencial de serem fontes recorrentes de contaminação ou recontaminação aos alimentos.

BAL representaram a população dominante nas superfícies das bancadas de produção em que foram detectadas (queijarias A e B no período chuvoso e queijarias A, B e C no período seco). A presença de BAL nas superfícies de produção pode exercer um efeito de inoculação desses micro-

organismos tanto nos queijos (que permanecem sobre a bancada até adquirir consistência que permite a retirada da forma e transferência para prateleiras de maturação), como no soro-fermento (que flui sobre a superfície da bancada até gotejar em um recipiente no qual será acumulado para posterior utilização como fermento). Estudos mostraram que BAL isoladas de ambientes de processamento de derivados lácteos têm o potencial de produzir biofilmes e assim manter-se sobre as superfícies por longos períodos. A presença de biofilmes de BAL em superfícies relacionadas ao processamento contribui para a inoculação desses micro-organismos nos queijos e também previnem, por competição, que micro-organismos indesejáveis ocupem esse nicho (Muruzović *et al.*, 2018).

Se por um lado a presença de BAL em superfícies se apresenta como um achado desejável, por outro *Staphylococcus* spp. pode representar um perigo sanitário. Conforme observado na tabela 18, *Staphylococcus* spp. apresentaram uma população que excedeu os limites sugeridos (Sveum *et al.*, 1992; Galinari *et al.*; 2014) em três superfícies de bancada de produção de queijos analisadas (queijarias A, B e C), sendo em uma bancada o micro-organismo predominante (queijaria C). Nessas circunstâncias, a bancada de produção pode exercer um efeito inoculante desses micro-organismos nos queijos ou contaminar o soro durante a coleta do soro-fermento. Alguns estudos verificaram que *S. aureus* de origem láctea têm aptidão em expressar mecanismos relacionados à adesão em superfícies e formação de biofilmes nos mais diversos tipos de materiais. Tal potencial se apresenta como um perigo para a persistência desses micro-organismos nas superfícies de contato com os queijos (Glinska e Tkacikova, 2009; Silva *et al.*, 2017; Friedriczewski *et al.*, 2018).

Ao comparar esses resultados com os obtidos por Galinari *et al.* (2014), dispostos na tabela 5, observamos que, em geral, as bancadas de produção de QMA das regiões do Serro e da Serra da Canastra tinham contagens menores de *Staphylococcus* spp. e coliformes. Os autores também encontraram contagens superiores de BAL comparadas às contagens observadas nas queijarias do Campo das Vertentes.

As queijarias apresentaram discrepância entre suas microbiotas da superfície da bancada de produção. Tal afirmação fica evidente ao, por exemplo, comparar os resultados obtidos entre as queijarias A e D. Enquanto na queijaria A todos os indicadores pesquisados foram detectados, na queijaria D não foi constatada a presença desses micro-organismos. Procedimentos relacionados à higienização de superfícies, como o tipo de produto usado, a frequência de limpeza e desinfecção e a adoção de procedimentos recomendados podem estar relacionados às diferenças entre as contagens microbianas. Durante os estágios iniciais de formação do biofilme, essa comunidade microbiana é susceptível aos processos de higienização. Entretanto, quando consolidado, os biofilmes são capazes de resistir a esses fatores e persistir no ambiente, sendo uma fonte de contaminação e recontaminação dos alimentos (Jamal *et al.*, 2018). Além disso, o material de superfície pode influenciar o perfil de micro-organismos aderidos. Nas queijarias em que foram coletadas as amostras, as bancadas de produção eram de ardósia ou fibra de vidro.

As contagens de micro-organismos nas superfícies das prateleiras de 22 dias de maturação estão dispostas na tabela 19.



Tabela 19. Concentração de micro-organismos em prateleiras de queijos com 22 dias de maturação em queijarias registradas (n=4) para produção de queijo Minas artesanal da região do Campo das Vertentes – MG, durante as estações de seca

Análises	Queijarias				Padrão
	A	B	C	D	
Bactérias ácido-láticas (log UFC/cm <sup>2</sup> )	3,7	1,9	3,5	3,8	-
Coliformes a 30 °C (log NMP/cm <sup>2</sup> )	-	-	-	-	1,4
Coliformes a 45 °C (log NMP/cm <sup>2</sup> )	-	-	-	-	0,7
<i>Staphylococcus</i> spp. (log UFC/cm <sup>2</sup> )	4,0	3,3	4,1	3,3	0,7
<i>Staphylococcus</i> coagulase positivo (log UCF/cm <sup>2</sup> )	3,3	-	-	-	0,7

Valores ausentes (-) representam contagens abaixo do limite mínimo de detecção da técnica.

Nas prateleiras de todas as queijarias analisadas foi observada a presença de BAL e a não detecção de coliformes a 30 °C e 45 °C. Esses resultados são desejáveis, uma vez que essas superfícies são destinadas aos queijos de 22 dias de maturação, que estão prontos para serem embalados e comercializados. Dessa forma, as prateleiras exercem o efeito de inoculação de micro-organismos benéficos e minimizam a ocorrência de recontaminação do produto finalizado com micro-organismos de importância higiênica-sanitária, como os coliformes.

Apesar da não detecção de coliformes, o perigo microbiológico não pode ser desconsiderado. *Staphylococcus* spp. se mostrou como um dos micro-organismos mais predominantes nas prateleiras de todas as queijarias. Considerando os padrões propostos por Sveum *et al.* (1992) e Galinari *et al.* (2014), as prateleiras apresentaram contagens de *Staphylococcus* spp. cerca de cinco vezes superiores ou valor sugerido. Esse resultado representa um achado importante, uma vez que demonstra que o queijo em condições legais de comercialização está exposto a uma fonte de micro-organismos envolvidos em intoxicações alimentares.

Além disso, na queijaria A também foi detectada a presença de *Staphylococcus* coagulase-positivo, que é um indicador sanitário do queijo contemplado pela legislação (Minas Gerais, 2008). *Staphylococcus* coagulase-positivo também foi detectado na bancada de produção da mesma queijaria, conforme apresentado na tabela 18. Esses resultados sugerem que, provavelmente, tal micro-organismo esteja amplamente adaptado e difundido no ambiente da queijaria A.

Com base nos resultados obtidos, observa-se que, embora as superfícies das queijarias analisadas tenham um predomínio de BAL, isso não elimina o perigo higiênico-sanitário. Portanto, sugere-se atenção à execução dos procedimentos de limpeza e desinfecção de superfícies para eliminação de micro-organismos indesejáveis e prevenção da formação de biofilmes.

## 5.6. Qualidade microbiológica de queijo Minas artesanal durante a maturação

Os resultados das análises microbiológicas dos queijos Minas artesanais ao longo de 60 dias de maturação, produzidos na estação chuvosa e seca, estão dispostos na tabela 20.

Tabela 20. Medianas de parâmetros microbiológicos pesquisados durante a maturação de queijos Minas artesanais produzidos em queijarias registradas (n=4) no Campo das Vertentes - MG, nas estações seca e chuvosa

Análises	Estação	Dias de maturação					Padrão
		1	7	14	22	60	
Bactérias ácido-láticas (UFC/g)	Chuva	2,5 x 10 <sup>6</sup> Aa	2,2 x 10 <sup>8</sup> Aa	1,4 x 10 <sup>8</sup> Aa	8,2 x 10 <sup>7</sup> Aa	5,6 x 10 <sup>7</sup> Aa	-
	Seca	1,5 x 10 <sup>8</sup> Aa	1,1 x 10 <sup>8</sup> Aa	1,7 x 10 <sup>8</sup> Aa	1,6 x 10 <sup>8</sup> Aa	2,5 x 10 <sup>6</sup> Aa	
Bolores e Leveduras (UFC/g)	Chuva	8 x 10 <sup>4</sup> Ba	3,6 x 10 <sup>7</sup> Aa	8,7 x 10 <sup>6</sup> Ba	5,8 x 10 <sup>6</sup> Ba	6 x 10 <sup>6</sup> Aa	-
	Seca	1,4 x 10 <sup>8</sup> Aa	1,5 x 10 <sup>8</sup> Aa	1,4 x 10 <sup>8</sup> Aa	7,1 x 10 <sup>7</sup> Aa	2,8 x 10 <sup>6</sup> Aa	
Coliformes a 30 °C (NMP/g)	Chuva	> 1,1 x 10 <sup>5</sup> Aa	6 x 10 <sup>4</sup> Aa	1,4 x 10 <sup>4</sup> Aa	> 1,1 x 10 <sup>5</sup> Aa	3,3 x 10 <sup>2</sup> Aa	5 x 10 <sup>3</sup>
	Seca	5,6 x 10 <sup>4</sup> Aa	1,4 x 10 <sup>4</sup> Aa	2,4 x 10 <sup>4</sup> Aa	3,1 x 10 <sup>3</sup> Aa	< 3 x 10 <sup>2</sup> Aa	
Coliformes a 45 °C (NMP/g)	Chuva	5,7 x 10 <sup>4</sup> Aa	1,2 x 10 <sup>3</sup> Aa	1,1 x 10 <sup>3</sup> Aa	9 x 10 <sup>2</sup> Aa	< 3 x 10 <sup>2</sup> Aa	5 x 10 <sup>2</sup>
	Seca	< 3 x 10 <sup>2</sup> Ba	< 3 x 10 <sup>2</sup> Aa	< 3 x 10 <sup>2</sup> Ba	< 3 x 10 <sup>2</sup> Aa	< 3 x 10 <sup>2</sup> Aa	
<i>Staphylococcus</i> spp. (UFC/g)	Chuva	2,5 x 10 <sup>5</sup> Aa	6 x 10 <sup>6</sup> Aa	3,6 x 10 <sup>7</sup> Aa	2,6 x 10 <sup>7</sup> Aa	4 x 10 <sup>7</sup> Aa	-
	Seca	3,9 x 10 <sup>5</sup> Aa	9,7 x 10 <sup>6</sup> Aa	1,6 x 10 <sup>7</sup> Aa	5,1 x 10 <sup>7</sup> Aa	5,8 x 10 <sup>6</sup> Aa	
<i>Staphylococcus coagulase</i> positivo (UCF/g)	Chuva	1,5 x 10 <sup>4</sup> Aa	< 1 x 10 <sup>4</sup> Aa	< 1 x 10 <sup>4</sup> Aa	< 1 x 10 <sup>4</sup> Aa	< 1 x 10 <sup>4</sup> Aa	1 x 10 <sup>3</sup>
	Seca	1,6 x 10 <sup>5</sup> Aa	3,5 x 10 <sup>4</sup> Aa	2,9 x 10 <sup>4</sup> Aa	< 1 x 10 <sup>3</sup> Aa	< 1 x 10 <sup>3</sup> Aa	
<i>Salmonella</i> spp. (presença/25 g)	Chuva	Ausência	Ausência	Ausência	Ausência	Ausência	Ausência
	Seca	Ausência	Ausência	Ausência	Ausência	Ausência	

<sup>a</sup>Medianas com sobrescritos iguais na linha indicam semelhança pelo teste de Friedman (P < 0,05);

<sup>A-B</sup>Medianas com sobrescritos distintos diferem significativamente na coluna pelo teste de Friedman (P < 0,05).

As medianas obtidas não variaram estatisticamente ao longo do período de maturação, mas para alguns períodos de maturação houve variação conforme a estação seca ou chuvosa para coliformes a 45 °C e bolores e leveduras.

Em geral, as BAL foram os micro-organismos predominantes nos queijos, independentemente do período de maturação e da estação climática. As medianas se assimilaram às contagens dessas bactérias encontradas em outros estudos (Oliveira, 2014; Castro *et al.*, 2016). A contagem de BAL nos queijos foi superior à encontrada nas matérias-primas (leite cru e soro-fermento). Esse achado pode ser explicado pelo efeito de concentração de células microbianas na massa do queijo com a remoção do soro, associada à constante multiplicação desses micro-organismos (Souza *et al.*, 2003). Além disso, a presença de BAL nas superfícies das bancadas de produção (tabela 18) e das prateleiras de maturação (tabela 19) pode também ter exercido esse efeito inoculante.

A contagem inicial desses micro-organismos nos queijos não apresentou diferença significativa entre as épocas da seca e da chuva (P > 0,05). Esse resultado provavelmente se deve às características microbiológicas das matérias-primas. Conforme apresentado nas tabelas 13 e 15, o soro-fermento e o leite cru apresentaram as mesmas contagens de BAL nas duas épocas do ano.

Os queijos produzidos na época seca apresentaram aproximadamente duas graduações da escala logarítmica a mais nas contagens iniciais de BAL, comparado aos queijos da estação chuvosa. A diferença no volume de soro-fermento adicionado ao leite nas diferentes estações pode explicar essa ocorrência. Camargo *et al.* (2021) observaram que o volume de soro-fermento adicionado ao queijo pode variar de 100 a 500 mL/100 L de leite cru. Costa Júnior *et al.* (2014) e Castro *et al.* (2016) constataram que no período seco alguns queijeiros do Campo das Vertentes adicionam maior volume de soro-fermento ao leite. Essa prática é usada como forma de evitar o retardamento do processo de coagulação, que levaria à produção de queijos com consistência exageradamente macia.

Além disso, as baixas temperaturas do período seco podem limitar o metabolismo das BAL ao longo da maturação. Para compensar os efeitos dessa limitação, os produtores adicionam maior volume de fermento e, conseqüentemente, inoculam maior concentração de bactérias ao queijo. Tal limitação foi observada nos períodos de avaliação subsequentes: a população de BAL dos

queijos maturados no período seco praticamente se manteve constante, enquanto que nos queijos maturados no período chuvoso essa concentração apresentou uma tendência de aumento.

A competição microbiana é outro fator que também pode justificar esse resultado. No período chuvoso foi observada maior contagem inicial de coliformes comparado ao período seco. Assim como BAL, coliformes também utilizam lactose em suas vias fermentativas. Aragon-Alegro *et al.* (2021) destacaram que a fermentação da lactose em queijos exercida por coliformes pode impedir o crescimento de outros patógenos, como *L. monocytogenes*. Portanto, a competição por esse nutriente pode ter contribuído para que a população de BAL encontrasse um ambiente mais desafiador no período chuvoso.

Nos estágios mais avançados de maturação, era esperada uma tendência de diminuição das contagens de BAL. Isso pode ser constatado devido a algumas alterações físico-químicas que ocorrem no queijo, como aumento da acidez e diminuição do teor de umidade, que serão tratadas de forma mais detalhada no próximo tópico (Mugamposa *et al.*, 2020). Embora tenha sido constatada diminuições nas contagens de BAL ao longo da maturação nas duas estações climáticas, essas reduções não foram estatisticamente significativas ( $P > 0,05$ ).

Coliformes apresentaram NMP acima dos valores estabelecidos pela legislação (Minas Gerais, 2008). Entretanto, essas contagens iniciais não se distinguiram às observadas por outros autores (Oliveira, 2014; Rezende, 2014; Castro *et al.*, 2016; Sá *et al.*, 2021). Como esperado, no período chuvoso foi observada maior NMP de coliformes. Alterações ambientais características dessa estação, como formação de barro, altas temperaturas e umidade ambiental podem ter contribuído para esse resultado (Castro *et al.*, 2016).

Em geral, o NMP de coliformes apresentou uma tendência de diminuição ao longo da maturação. Esse fenômeno pode ser explicado pelo efeito dos mecanismos inibitórios exercidos por BAL durante a maturação dos queijos (Morandi *et al.*, 2019). A presença de coliformes no soro-fermento e no leite cru pode justificar a detecção dessas bactérias nos queijos recém-produzidos. Entretanto, em alguns momentos específicos, como aos 22 dias de maturação durante o período chuvoso, foi observado um aumento do NMP de coliformes a 30 °C. Ao considerar que o ambiente do queijo se torna impróprio ao desenvolvimento de coliformes ao longo da maturação, a hipótese de multiplicação dos coliformes pré-existentes no queijo é pouco provável. Acredita-se que esse efeito possa ter sido causado por uma fonte externa ao queijo.

Aumento nas populações de coliformes ao longo da maturação é sugestivo da ocorrência de recontaminações em virtude de falhas higiênicas durante a manipulação do produto. Dentre essas falhas, podem ser consideradas a má higienização das mãos dos manipuladores, a manipulação de queijos mais frescos antes de queijos mais maturados e o inadequado posicionamento de queijos nas prateleiras de maturação. O soro resultante de queijos frescos colocados nas prateleiras elevadas pode gotejar sobre queijos maturados posicionados abaixo e carrear micro-organismos (Ramón *et al.*, 2017). Também, deve ser considerado que coliformes foram detectados na água de uma queijaria nas análises feitas durante o período seco (tabela 10), o que a torna uma importante fonte de contaminação dos produtos. Além disso, durante a coleta das amostras no período chuvoso, foi observado que uma queijaria enfrentava problemas de infestação de moscas no ambiente de maturação. Ao pousar sobre os queijos, as moscas podem inocular coliformes aos produtos, entre outros micro-organismos (Cardozo *et al.*, 2009).

Apesar de coliformes a 30 °C terem sido detectados nas duas estações climáticas, não foi observado o estufamento precoce nos queijos. Mullan (2000) destacou que a produção de gás por

coliformes em queijos é mais intensa nos casos em que as BAL apresentam alguma restrição de seu metabolismo, como na presença de resíduos de antimicrobianos e/ou bacteriófagos. Entretanto, BAL foi a população dominante nos queijos analisados e isso pode ter contribuído para evitar o defeito. Além disso, Trmčić *et al.* (2016) afirmaram que a simples presença de coliformes não é suficiente para que o estufamento precoce ocorra, uma vez que o processo é dependente de outros fatores como pH e atividade de água.

Por outro lado, coliformes a 45 °C apresentou NMP estatisticamente maiores ( $P < 0,05$ ) período chuvoso, indicando a contaminação do produto por materiais de origem fecal. O mesmo achado foi citado por trabalhos realizados na mesma região (Oliveira, 2014; Castro *et al.*, 2016). Além de causarem deterioração dos queijos, coliformes a 45 °C têm implicação em saúde pública. Entretanto, ao longo da maturação os coliformes a 45 °C atingiram níveis abaixo do limite de detecção da técnica, considerando as diluições utilizadas, reduzindo o potencial perigo sanitário.

Não foi detectada *Salmonella* spp. nos queijos, independentemente do período de maturação e da época do ano. Apesar de esse micro-organismo ter sido encontrado em queijos artesanais, os estudos feitos anteriormente na região também destacaram sua ausência (Oliveira, 2014; Rezende, 2014; Castro *et al.*, 2016; Sá *et al.*, 2021). A ausência de *Salmonella* spp. nas matérias-primas, como leite cru e soro-fermento, contribuiu para esse resultado. Entretanto, esse micro-organismo pode contaminar os queijos a partir de outras fontes, como as mãos do manipulador e as contaminações cruzadas (Mukherjee *et al.*, 2019). Os cuidados com a higiene pessoal associado ao ambiente competitivo do queijo, com dominância de BAL, assegurou de manter aquele ambiente inadequado ao estabelecimento de *Salmonella* spp., que reconhecidamente é descrita como uma inábil competidora (Acurcio *et al.*, 2017; Lobacz e Zulewska, 2021).

*Staphylococcus* spp. se apresentou como um micro-organismo abundante nos queijos, independentemente do período de maturação e época do ano. A mesma tendência foi observada em outros estudos realizados na região (Oliveira, 2014; Rezende, 2014; Sá *et al.*, 2014). Essas bactérias provavelmente foram originadas do leite cru, soro-fermento e superfícies de bancada de produção, uma vez que as análises microbiológicas dessas amostras também indicaram a presença do micro-organismo.

A persistência de *Staphylococcus* spp. ao longo da maturação pode indicar recontaminação dos queijos. Cabe ressaltar que essas bactérias estavam presentes nas superfícies das prateleiras de maturação, e essa pode ser uma fonte constante de recontaminação. Outra provável fonte de recontaminação são os manipuladores. Entre 20 e 60 % da população é portadora assintomática de *Staphylococcus* spp. nos seguintes sítios anatômicos: mãos, orofaringe, vestibulos nasais e leito subungueal (Etter *et al.*, 2020).

*Staphylococcus* spp. podem apresentar tolerância à acidez e à dessecação, que são os principais fatores relacionados com a diminuição de indicadores higiênicos-sanitários nos queijos ao longo da maturação (Chaibenjawong e Foster, 2011). Associada às prováveis recontaminações, a tolerância natural desse micro-organismo ao ambiente dos queijos pode ter contribuído para sua persistência durante a maturação.

Em relação à *Staphylococcus* coagulase positivo, esses micro-organismos foram detectados apenas nos queijos com um dia de maturação no período chuvoso e nos queijos entre um e 14 dias no período seco. Embora o gênero *Staphylococcus* se mantenha sempre em contagens elevadas ao longo da maturação, *Staphylococcus* coagulase positivo apresentou tendência de diminuir as contagens até níveis indetectáveis para as diluições utilizadas. Esse mesmo comportamento foi

observado por Figueiredo (2018) ao analisar os QMA produzidos na mesorregião da Serra do Salitre – MG. A presença desses micro-organismos se constitui como um potencial perigo sanitário aos consumidores. Castro *et al.* (2020) identificaram a presença de genes produtores de enterotoxinas em *Staphylococcus* spp. isolados de QMA produzidos na mesorregião do Campo das Vertentes.

A literatura científica tem demonstrado que contagens a partir de  $1 \times 10^4$  UFC/g são suficientes para que enterotoxinas sejam produzidas de forma significativa (Zeleny *et al.*, 2016; Martínez-Vasallo *et al.*, 2019). *Staphylococcus* coagulase positivo não foram detectados aos 22 dias de maturação, fato que confere aos queijos o atendimento à legislação quanto a esse parâmetro. Todavia, a diminuição da contagem desses micro-organismos ou sua completa eliminação não elimina o perigo sanitário inerente a esse micro-organismo. Devido sua tolerância a fatores como temperatura, pH e atividade proteolítica de enzimas, as enterotoxinas são capazes de persistir ativas nos queijos mesmo quando *Staphylococcus* spp. não estão mais viáveis (Zeleny *et al.*, 2016; Martínez-Vasallo *et al.*, 2019).

Embora a legislação estadual contemple limites aceitáveis para *Staphylococcus* coagulase positivo no QMA (Minas Gerais, 2008), a literatura científica destaca o fato que amostras negativas no teste de coagulase também podem produzir enterotoxinas. Andrade *et al.* (2019) observaram que 46,8 % das 55 amostras de *Staphylococcus* coagulase negativo isolados de queijos coalho portavam genes envolvidos com a síntese de enterotoxinas. Nascimento *et al.* (2020) identificaram 204 amostras de *Staphylococcus* coagulase negativo em queijos Emmental. Dessas, 6,9 % apresentaram genes de produção de enterotoxinas na análise molecular. Com base nessas informações, ressalta-se que os cuidados com a produção e manipulação dos queijos devem ser criteriosos a fim de reduzir esse perigo.

Embora não haja padrões para as contagens de bolores e leveduras em queijos, a presença desses micro-organismos era um achado esperado. Esses micro-organismos podem se originar das matérias-primas usadas na produção dos queijos (soro-fermento e leite cru) e também estarem difundidos no ambiente de maturação.

O crescimento de mofos nas superfícies de queijos é considerado um fenômeno usual. Na maioria das vezes, tais mofos são removidos durante a etapa de toalete dos queijos e não são visualmente percebidos pelos consumidores. Entretanto, o conceito de queijos mofados tem cada vez mais se difundido. Para atender tal demanda, produtores não realizam a etapa de remoção do mofo de alguns queijos para apresentar o produto com essas características (Pineda *et al.*, 2021).

Bolores e leveduras foi o parâmetro microbiológico com maior variação de resultados em virtude da época do ano. Em alguns períodos de maturação (um, 14 e 22 dias) a diferença entre a concentração desses micro-organismos na época da chuva e da seca foi estatisticamente significativa ( $P < 0,05$ ). Em geral, no período seco foram observadas as maiores contagens de bolores e leveduras associado às menores contagens de BAL. O mesmo perfil foi encontrado por Castro *et al.* (2016) em QMA frescos produzidos na mesorregião do Campo das Vertentes. Algumas hipóteses podem justificar a maior contagem de bolores e leveduras nos queijos do período seco ( $P < 0,05$ ). Diferentemente das bactérias, os fungos comumente presentes em queijos possuem temperatura ótima de crescimento em uma faixa mais amena, que pode variar de 2 °C até 30 °C, dependendo da espécie (Fröhlich-Wyder *et al.*, 2019). As temperaturas ambientais mais baixas observadas no período seco podem ter contribuído para que os bolores e leveduras expressassem seu metabolismo mais intensamente e não é a melhor temperatura para a maioria

das bactérias. Além disso, o clima mais seco favorece a formação e disseminação de poeira, que pode carrear esporos fúngicos até os queijos (Rosas *et al.*, 2020).

Bolores e leveduras tenderam a manter concentrações elevadas durante todo o período de maturação, enquanto que outros indicadores microbiológicos apresentaram diminuições. Na medida em que os queijos se desidratam e acidificam, o meio se torna impróprio para o desenvolvimento de alguns micro-organismos. Entretanto, bolores e leveduras são mais resistentes a essas condições e, mesmo em ambientes ácidos e com baixa umidade, como em queijos maturados, eles conseguem se manter (Banjara *et al.*, 2015).

Embora bolores e leveduras possam estar relacionados ao desenvolvimento de características sensoriais desejáveis aos queijos, esses também podem ser indicadores das condições higiênicas dos equipamentos, utensílios e instalações da queijaria. Além disso, a presença desses micro-organismos pode representar um perigo aos consumidores, dada a capacidade de algumas espécies produzirem micotoxinas (Torkar e Teger, 2006). Diante disso, compreender de forma mais aprofundada a interação desse grupo de micro-organismos com os queijos e com o ambiente das queijarias é um aspecto a ser abordado em futuros estudos.

As análises microbiológicas indicaram que os queijos têm uma desejável população de BAL. Entretanto, a presença de indicadores higiênico-sanitários alerta para que contaminações/recontaminações possam estar acontecendo durante as etapas de produção e maturação dos queijos. Portanto, sugere-se que os preceitos de BPA e BPF sejam criteriosamente seguidos, como forma de minimizar a ocorrência dessa situação.

### **5.7. Qualidade físico-química de queijo Minas artesanal durante a maturação**

Os resultados das análises físico-químicas dos queijos ao longo do período de maturação na época das chuvas e da seca estão dispostos na tabela 21.

Não foi observado efeito significativo da época do ano sobre os parâmetros físico-químicos dos queijos ( $P > 0,05$ ). Apesar de ser um resultado inesperado, tal achado destaca que os queijos mantiveram suas características mesmo expostos a diferentes condições climáticas. Em outras palavras, mesmo produzidos artesanalmente, os queijos apresentaram uma padronização do ponto de vista físico-químico ao longo do ano. Entretanto, estudos destacaram a dificuldade de produtores em manter o padrão de queijos artesanais em diferentes estações (Nyamakwere *et al.*, 2021; Penna *et al.*, 2021).

Tabela 21. Médias e desvios-padrão de parâmetros físico-químicos durante maturação de queijos Minas artesanais produzidos em queijarias registradas (n=4) no Campo das Vertentes - MG, nas estações seca e chuvosa

Análises	Estação	Dias de maturação					Padrão
		1	7	14	22	60	
Acidez (g/100g)	Chuva	0,14 <sup>Aa</sup> ± 0,06	0,24 <sup>Ab</sup> ± 0,05	0,31 <sup>Ab</sup> ± 0,05	0,48 <sup>Abc</sup> ± 0,11	0,54 <sup>Ac</sup> ± 0,07	-
	Seca	0,16 <sup>Aa</sup> ± 0,06	0,31 <sup>Aab</sup> ± 0,1	0,38 <sup>Abc</sup> ± 0,09	0,51 <sup>Acd</sup> ± 0,15	0,56 <sup>Ad</sup> ± 0,03	-
pH	Chuva	5,48 <sup>Aa</sup> ± 0,38	5,31 <sup>Aa</sup> ± 0,21	5,44 <sup>Aa</sup> ± 0,14	5,31 <sup>Aa</sup> ± 0,14	5,25 <sup>Aa</sup> ± 0,19	-
	Seca	5,28 <sup>Aa</sup> ± 0,32	5,12 <sup>Aa</sup> ± 0,28	5,08 <sup>Aa</sup> ± 0,15	5,1 <sup>Aa</sup> ± 0,21	5,39 <sup>Aa</sup> ± 0,15	-
Umidade (g/100g)	Chuva	55,03 <sup>Aa</sup> ± 2,67	42,98 <sup>Ab</sup> ± 3,38	41,3 <sup>Ab</sup> ± 2,34	37,7 <sup>Ab</sup> ± 2,45	26,13 <sup>Ac</sup> ± 0,93	≤ 45,9
	Seca	57,9 <sup>Aa</sup> ± 6,89	49,47 <sup>Aab</sup> ± 3,92	44,74 <sup>Abc</sup> ± 6,56	39,09 <sup>Acd</sup> ± 7,63	28,8 <sup>Ad</sup> ± 7,66	
Sólidos totais (g/100g)	Chuva	44,97 <sup>Aa</sup> ± 2,67	57,02 <sup>Ab</sup> ± 3,38	58,7 <sup>Ab</sup> ± 2,34	62,3 <sup>Ab</sup> ± 2,45	73,87 <sup>Ac</sup> ± 0,93	-
	Seca	42,1 <sup>Aa</sup> ± 6,89	50,53 <sup>Aab</sup> ± 3,92	55,26 <sup>Abc</sup> ± 6,56	60,91 <sup>Acd</sup> ± 7,63	71,2 <sup>Ad</sup> ± 7,66	-
Gordura (g/100g)	Chuva	22,13 <sup>Aa</sup> ± 5,14	29,79 <sup>Aab</sup> ± 2,9	32,79 <sup>Ab</sup> ± 2,65	34,75 <sup>Abc</sup> ± 1,47	43,33 <sup>Ac</sup> ± 2,38	-
	Seca	21,63 <sup>Aa</sup> ± 6,59	25,17 <sup>Aab</sup> ± 3,69	29,67 <sup>Aab</sup> ± 4,38	31,25 <sup>Abc</sup> ± 5,12	39,75 <sup>Ac</sup> ± 6	-
GES (g/100g)	Chuva	48,85 <sup>Aab</sup> ± 8,91	47,46 <sup>Aa</sup> ± 3,09	55,81 <sup>Aab</sup> ± 2,9	55,79 <sup>Aab</sup> ± 1,13	58,67 <sup>Ab</sup> ± 3,41	-
	Seca	50,64 <sup>Aa</sup> ± 6,54	49,7 <sup>Aa</sup> ± 4,91	53,86 <sup>Aa</sup> ± 7,03	51,17 <sup>Aa</sup> ± 3,37	53,13 <sup>Aa</sup> ± 5,51	-
Proteína (g/100g)	Chuva	16,16 <sup>Aa</sup> ± 0,78	22,32 <sup>Ab</sup> ± 1,95	23,47 <sup>Abc</sup> ± 2	23,55 <sup>Abc</sup> ± 1,61	26,79 <sup>Ac</sup> ± 4	-
	Seca	15,21 <sup>Aa</sup> ± 1,45	18,37 <sup>Aab</sup> ± 1,03	20,24 <sup>Ab</sup> ± 2,2	21,82 <sup>Ab</sup> ± 2,02	26,48 <sup>Ac</sup> ± 2,34	-
Resíduo mineral fixo (g/100 g)	Chuva	3,15 <sup>Aa</sup> ± 0,36	3,95 <sup>Aa</sup> ± 0,76	3,34 <sup>Aa</sup> ± 0,46	3,86 <sup>Aa</sup> ± 0,39	4,05 <sup>Aa</sup> ± 1,27	-
	Seca	3,17 <sup>Aa</sup> ± 0,88	4,86 <sup>Aab</sup> ± 1,44	4,51 <sup>Aab</sup> ± 1,45	5,04 <sup>Aab</sup> ± 1,34	6,08 <sup>Ab</sup> ± 2,09	-
Cloretos (g/100 g)	Chuva	1,05 <sup>Aa</sup> ± 0,29	1,07 <sup>Aa</sup> ± 0,11	1,02 <sup>Aa</sup> ± 0,32	1,26 <sup>Aa</sup> ± 0,43	1,47 <sup>Aa</sup> ± 0,87	-
	Seca	1,33 <sup>Aa</sup> ± 0,94	2,19 <sup>Aa</sup> ± 1,09	2,31 <sup>Aa</sup> ± 1,34	2,35 <sup>Aa</sup> ± 1,48	2,4 <sup>Aa</sup> ± 1,47	-

<sup>a-d</sup>Médias com sobrescritos distintos diferem significativamente na linha pelo teste de Tukey (P < 0,05);

<sup>A</sup>Médias com sobrescritos iguais indicam semelhança estatística na coluna pelo teste de Sidak (P < 0,05);

GES: Gordura no extrato seco.

A acidez titulável dos queijos apresentou aumentos significativos (P < 0,05) ao longo do período de maturação, independentemente da estação climática. Esperava-se que o desenvolvimento de acidez titulável dos queijos maturados no período chuvoso fosse mais acentuado, uma vez que as altas temperaturas ambientais, típicas dessa época, favorecem o metabolismo fermentativo dos micro-organismos. Entretanto, a maior contagem inicial de BAL, conforme abordado na tabela 20, pode ter contribuído para que a produção de ácidos no período seco se equivalesse à do período chuvoso. Oliveira (2014) também não observou diferenças significativas na acidez titulável de QMA entre as diferentes estações climáticas. Por outro lado, Castro *et al.* (2016) constataram essa diferença ao avaliar os queijos oriundos de produtores não certificados do Campo das Vertentes.

O desenvolvimento de acidez observado ao longo da maturação pode ser considerado um dos principais fatores que levaram a diminuição nas contagens de micro-organismos indesejáveis, como coliformes a 30 °C, coliformes a 45 °C e *Staphylococcus coagulase* positivo.

O pH dos queijos não foi significativamente influenciado pelo período de maturação ou época do ano (P > 0,05). Os valores encontrados são condizentes aos observados por outros estudos realizados no Campo das Vertentes (Costa Júnior *et al.*, 2014; Oliveira, 2014; Castro *et al.*, 2016). Esperava-se que o pH dos queijos diminuísse ao longo da maturação como reflexo do aumento da acidez. Entretanto, alguns fenômenos que ocorrem concomitantemente à fermentação da lactose residual dos queijos previnem a redução do pH. Ao longo da maturação, ocorre a lise de proteínas pela ação de enzimas oriundas do próprio leite, do agente coagulante e de micro-organismos. Alguns produtos oriundos da degradação de proteínas são alcalinos e, conseqüentemente, tendem a aumentar o pH dos queijos. Além disso, bolores e leveduras são capazes de usar o ácido láctico em seu metabolismo energético (Zaravela *et al.*, 2021).

O teor de umidade dos queijos não apresentou diferenças estatísticas entre as épocas do ano (P > 0,05). Era esperado que os queijos produzidos no período seco se desidratassem mais facilmente, devido à baixa umidade relativa do ar. Cientes de que a desidratação excessiva dos queijos pode

causar defeitos, como a rachadura de cascas, os produtores adotam algumas estratégias para minimizar essa ocorrência durante o período seco. Costa Júnior *et al.* (2014) observaram que produtores de QMA do Campo das Vertentes durante o período seco cortam a massa dos queijos em grãos com maiores dimensões para evitar a perda de umidade. Além disso, durante a enformagem é aplicada uma menor pressão manual na massa para minimizar a drenagem do soro. Alguns produtores podem ainda lavar os queijos mais precocemente no período da seca para prevenir o ressecamento excessivo. Tais artifícios podem ter contribuído para que o teor de umidade dos queijos mantivesse o mesmo padrão mesmo exposto a diferentes condições climáticas.

Castro *et al.* (2016) encontraram maior teor de umidade em QMA frescos produzidos no período seco. Os autores observaram teor de umidade de 55,97 g/100 g no período da seca e 49,35 g/100 g no período chuvoso. Costa Júnior *et al.* (2014) e Oliveira (2014) também observaram teores de umidade mais elevados nos QMA elaborados no período seco. Essas observações podem ser atribuídas aos motivos citados no parágrafo anterior que previnem o ressecamento excessivo das peças de queijos.

Entre os dias um e sete de maturação foi observada uma maior intensidade de perda de umidade, comparada aos outros períodos de avaliação. No início do período de maturação, dois fenômenos estão envolvidos na perda de umidade dos queijos: a evaporação superficial de água e a sinérese. Com o avanço da maturação, a evaporação superficial continua a ocorrer, mas a drenagem de soro da massa gradativamente reduz até cessar (Figueiredo, 2018; Bettera *et al.*, 2020).

A perda de umidade dos queijos ao longo da maturação pode ser relacionada à diminuição de alguns indicadores microbianos, como *Staphylococcus* coagulase positivo e coliformes, observado na tabela 20. Além disso, esse fenômeno leva à concentração dos componentes sólidos dos queijos. Os sólidos totais dos queijos, compostos principalmente pela gordura, proteínas e minerais, representam a contraparte do teor de umidade. Em outras palavras, a soma das frações de umidade e sólidos totais equivalem a 100 % da matéria dos queijos. Dessa forma, a oscilação que ocorre no teor de umidade influencia inversamente o teor de sólidos: enquanto o teor de umidade diminui ao longo da maturação, observa-se um aumento do teor de sólidos totais dos queijos.

Apesar de não ter sido observada influência significativa das estações climáticas sobre o teor de sólidos ( $P > 0,05$ ) em QMA da mesorregião do Campo das Vertentes, Moreno (2013) observou diferenças entre a época da chuva e da seca. Após 30 dias de maturação, o autor observou teor de sólidos médios de 67,4 g/100 g nos queijos do período chuvoso e 61 g/100 g no período seco.

A tendência do teor de gordura se elevar ao longo da maturação também é um reflexo da perda de umidade dos queijos. Os valores encontrados nesse estudo foram condizentes aos observados por Figueiredo (2018). Ao analisar QMA produzidos na mesorregião da Serra do Salitre, o autor observou teor médio de gordura de 23,69 g/100g nos queijos de um dia de maturação e de 41,31 g/100 g após 63 dias. Por outro lado, Castro *et al.* (2016) encontraram teores médios de gordura mais elevados em QMA da mesorregião do Campo das Vertentes produzidos por produtores não registrados. Nas épocas da seca e chuva, os valores encontrados foram, respectivamente, 28,28 g/100 g e 29,06 g/100 g. Oliveira (2014) também encontrou teores médios de gordura iniciais próximos à 30 g/100 g no período chuvoso. Após 60 dias de maturação, esse valor aumentou para aproximadamente 40 g/100g.



De acordo com a classificação dos queijos quanto ao teor de GES, proposto pela Portaria nº 146, todos os queijos, independentemente de época do ano e período de maturação, foram classificados como “gordo” (Brasil, 1996). Apesar da classificação não se alterar, pode ser observado uma tendência de aumento do teor da GES dos queijos. O efeito de concentração pela perda de umidade não justifica esse achado. A GES é determinada com base na matéria seca, sendo dessa forma totalmente independente do teor de água do produto. Diante disso, pode-se teorizar que o aumento da gordura no extrato seco pode estar ocorrendo em virtude da redução no teor de algum componente sólido do queijo. Provavelmente a proteólise, que é um dos principais eventos bioquímicos que ocorre nos queijos durante a maturação, está envolvida com essa variação. A diminuição do teor de proteínas exerce o efeito de concentração dos demais componentes sólidos em relação ao teor total de sólidos, como observado nos resultados da GES (Moreno, 2013; Carneiro *et al.*, 2020). Embora a lipólise também seja um evento bioquímico observado durante a maturação de queijos, os resultados obtidos nas análises dos teores de gordura e GES são pouco sugestivos da sua ocorrência em uma escala significativa (Georgala, 2017).

Corroborando com a hipótese da ocorrência de proteólise, pode ser observado que, embora o teor de proteínas tenha aumentado ao longo da maturação como reflexo da perda de umidade, esse aumento foi menos intenso se comparado ao aumento do teor de gordura. Se por um lado a perda de umidade leva a concentração de proteínas, por outro a proteólise age reduzindo a concentração desse composto. Esses diferentes fenômenos ocorrendo simultaneamente provavelmente evitaram que o efeito de concentração de proteínas fosse tão acentuado como o de gordura. Em outros estudos foram observados aumentos mais expressivos da concentração de proteínas durante a maturação, sugerindo menor intensidade do processo de proteólise (Figueiredo, 2018).

Embora o teor de proteínas não tenha sido influenciado pela época do ano ( $P > 0,05$ ), Moreno (2013) mostrou que os queijos produzidos no Campo das Vertentes tinham uma concentração proteica significativamente maior no período chuvoso. O motivo para essa variação foi a influência da dieta dos animais sobre a composição do leite cru destinado à produção de queijos. Entretanto, no atual estudo também não foram identificadas diferenças significativas ( $P > 0,05$ ) da composição do leite entre as diferentes estações climáticas.

As concentrações de resíduos minerais e cloretos também apresentaram tendência de se elevar ao longo da maturação devido a perda de umidade pelos queijos, embora a estatística tenha mostrado diferenças significativas apenas para o teor de minerais no período da seca ( $P < 0,05$ ). Os minerais dos queijos são compostos por diversas substâncias, sendo as principais delas o cálcio oriundo do leite e o cloreto de sódio oriundo da etapa de salga. Por serem elementos solúveis em água, as perdas que ocorrem durante a dessoragem e toalete impediram que o efeito de concentração ao longo da maturação fosse mais intenso. Figueiredo (2018) observou que o teor de minerais oscilou de 3,76 g/100 g para 5,59 g/100 g ao longo de 63 dias de maturação de QMA da mesorregião da Serra do Salitre. Apesar da ausência de diferenças significativa entre as épocas do ano sobre o teor de minerais ( $P > 0,05$ ), nota-se que os queijos do período seco possuíam um resíduo mineral fixo ligeiramente superior. Moreno (2013) também constatou a mesma variação nos queijos do Campo das Vertentes e atribuiu essa ocorrência à suplementação mineral fornecida às vacas leiteiras no período seco.

O teor de cloretos nos queijos está diretamente relacionado ao procedimento de salga. Devido ao caráter artesanal de produção dos queijos, a salga não é um procedimento padronizado em todas as queijarias. Cada estabelecimento usa seus próprios métodos no que diz respeito à quantidade de sal adicionada, tempo de exposição dos queijos ao sal e viragem dos queijos. Por esse motivo,

embora não tenha sido observada diferenças estatísticas entre as épocas do ano e períodos de maturação, o teor de cloretos apresentou grande variação entre as queijarias. Figueiredo (2018) também não observou diferenças estatística do teor de cloretos dos queijos ao longo da maturação ( $P > 0,05$ ).

Outro fator que influencia na concentração de cloretos é a umidade dos queijos, uma vez que essa facilita a dissolução e absorção do cloreto de sódio pela massa. Entretanto, assim como não houve diferença significativa da umidade inicial dos queijos entre as épocas do ano ( $P > 0,05$ ), também não foi observada diferença no teor de cloretos ( $P > 0,05$ ).

Na época seca praticamente todos os queijos apresentaram concentração de cloretos superior a 1,5 %. Esse valor é considerado um percentual capaz de inibir a atividade de alguns micro-organismos indesejáveis e ainda regula os processos de lipólise e proteólise (Moreno, 2013).

### **5.8. Adequação dos queijos à legislação**

Em termos de adequação à legislação, considerando os valores gerais das tabelas 20 e 21, os queijos produzidos na época da chuva atenderam a todos os requisitos legais com 60 dias de maturação. Mesmo o teor de umidade atingindo valor inferior a 45,9 g/100 g e *Staphylococcus* coagulase positivo não sendo detectados a partir do 7º dia, apenas com 60 dias esses queijos apresentaram NMP de coliformes a 30 °C e a 45 °C de acordo com os valores preconizados pela legislação (Minas Gerais, 2008).

Os queijos da época seca, por sua vez, atenderam aos parâmetros legais aos 22 dias de maturação, quando coliformes a 30 °C e *Staphylococcus* coagulase positivo apresentaram NMP e contagem, respectivamente, adequadas aos valores determinados. Entretanto, com um dia de maturação eles estavam adequados quanto ao NMP de coliformes a 45 °C e com 14 dias de maturação apresentava umidade menor de 45,9 g/100 g (Minas Gerais, 2008).

Em relação ao desempenho das queijarias quanto ao atendimento a esses padrões, na tabela 22 é mostrado o percentual de conformidades em função do período de maturação e época do ano.

Pode-se perceber que em nenhum período de maturação avaliado, independentemente da época do ano, 100 % das amostras estavam em conformidade com os parâmetros contemplados pela legislação. Mesmo aos 60 dias de maturação foi constatado que uma amostra de queijo no período de chuva não atendia a legislação quanto ao NMP de coliformes a 30 °C. O mesmo aconteceu na época seca, quando uma amostra apresentou contagens de *Staphylococcus* coagulase positivo acima do limite estabelecido.

Tabela 22. Percentual de amostras de queijo Minas artesanal de Campo das Vertentes (n=4) em conformidade com o Decreto nº 44.864/2008 e Portaria nº 146/1996 ao longo da maturação e em diferentes épocas do ano

Parâmetro	Estação	Dias de maturação				
		1	7	14	22	60
Umidade	Chuva	0 %	100 %	100 %	100 %	100 %
	Seca	0 %	25 %	50 %	100 %	100 %
Coliformes a 30 °C	Chuva	0 %	25 %	50 %	25 %	75 %
	Seca	50 %	50 %	25 %	75 %	100 %
Coliformes a 45 °C	Chuva	0 %	25 %	0 %	50 %	100 %
	Seca	100 %	100 %	75 %	75 %	100 %
<i>Staphylococcus</i> coagulase positivo	Chuva	75 %	100 %	100 %	100 %	100 %
	Seca	0 %	50 %	50 %	75 %	75 %
<i>Salmonella</i> spp.	Chuva	100 %	100 %	100 %	100 %	100 %
	Seca	100 %	100 %	100 %	100 %	100 %

A umidade dos queijos atingiu o limite máximo de 45,9 g/100 g aos sete dias de maturação no período chuvoso e aos 22 dias no período seco. Embora o período seco favoreça a perda de umidade dos queijos, estratégias citadas anteriormente (corte da massa em grãos de maiores dimensões e menor força aplicada na prensagem dos queijos) podem dificultar esse evento (Costa Júnior *et al.*, 2014). Portanto, os produtores devem encontrar um equilíbrio que concilie a prevenção do ressecamento excessivo dos queijos e a adequação do teor da umidade mais prematuramente.

O NMP de coliformes a 30 °C foi o indicador de qualidade ao qual houve mais dificuldade para atingir as adequações à legislação, observada principalmente no período chuvoso. Nessa estação, não foi obtido 100 % de conformidade das amostras em nenhum período de maturação. No período seco somente foi possível observar essa totalidade de adequação aos 60 dias de maturação. Nas duas estações climáticas foram constatadas diminuições no percentual de amostras com contagens adequadas entre sete e 22 dias de maturação, sendo esse fenômeno muito sugestivo da ocorrência de recontaminação.

Todas as queijarias na época da seca apresentaram queijos com NMP adequados de coliformes a 45 °C com um dia de maturação. Entretanto, prováveis recontaminações fizeram com que uma queijaria apresentasse não conformidade a esse parâmetro aos 14 e 22 dias. Na época da chuva, o maior desafio ambiental contribuiu para que as queijarias, em sua totalidade, se adequassem apenas aos 60 dias de maturação.

NMP de coliformes foi um problema mais recorrente no período chuvoso. No período seco foi constatada, em pelo menos uma amostra ao longo de toda maturação, a persistência de *Staphylococcus* coagulase positivo em concentração acima do estabelecido. No período chuvoso apenas uma amostra de queijo com um dia de maturação apresentou contagem desse micro-organismo que excedia o limite legal. Entretanto, a partir dos sete dias de maturação a bactéria não foi mais detectada nas amostras.

A pesquisa de *Salmonella* spp. foi o único parâmetro microbiológico que, em todos períodos de maturação e época do ano, se manteve no padrão estabelecido pela legislação.

Baseado nesses achados, percebe-se que ainda não há uma segurança microbiológica que permita considerar uma redução do período de maturação do QMA de Campo das Vertentes. Por outro lado, diversas amostras de queijos com um, sete e 14 dias de maturação apresentavam valores de vários parâmetros em acordo com o estabelecido pela legislação. Os resultados sugerem que algumas mudanças nas etapas de produção e maturação dos queijos, como a adoção mais

críteriosa das BPA e BPF, possibilite a produção de queijos com segurança em um período de maturação mais curto.

### 5.9. Identificação de bactérias ácido-lácticas isoladas de soro-fermento, leite cru, *swabs* e queijos

Com a realização da contagem de BAL nas amostras de soro-fermento, leite cru, *swabs* e queijos, foram isolados 70 morfotipos distintos de colônias. As identificações dos 70 morfotipos e sua relação com a amostra da qual foram isoladas estão dispostos na tabela 23.

Tabela 23. Identificação por espectrometria de massas MALDI-TOF de bactérias ácido-lácticas isoladas de soro-fermento, leite cru, *swabs* e queijo Minas artesanal em diferentes períodos de maturação e nas duas estações do ano

Amostra (morfotipos isolados)	Identificação
Soro-fermento (8)	<i>Lactococcus lactis</i> (5), espectros incompatíveis (1) e sem formação de espectros (2)
Leite cru (7)	<i>Lactobacillus paracasei</i> (1) e <i>Lactococcus lactis</i> (6)
Swab de bancada de produção (12)	<i>Enterococcus faecalis</i> (1), <i>Lactococcus lactis</i> (1), <i>Leuconostoc mesenteroides</i> (6), espectros incompatíveis (3) e sem formação de espectros (1)
Swab de prateleira de maturação (8)	<i>Candida parapsilosis</i> (2), <i>Lactobacillus brevis</i> (1), <i>Lactobacillus curvatus</i> (1), <i>Lactobacillus paracasei</i> (1), <i>Lactobacillus plantarum</i> (1), <i>Leuconostoc mesenteroides</i> (1) e sem formação de espectros (1)
Queijo Minas artesanal 1 dia de maturação (8)	<i>Lactobacillus plantarum</i> (3), <i>Lactococcus lactis</i> (2) e <i>Leuconostoc mesenteroides</i> (3)
Queijo Minas artesanal 7 dias de maturação (7)	<i>Lactobacillus curvatus</i> (2), <i>Lactobacillus paracasei</i> (3), <i>Lactococcus lactis</i> (1) e <i>Kodamaea ohmeri</i> (1)
Queijo Minas artesanal 14 dias de maturação (9)	<i>Lactobacillus curvatus</i> (1), <i>Lactobacillus plantarum</i> (2), <i>Lactococcus garvieae</i> (1), <i>Lactococcus lactis</i> (1), <i>Leuconostoc mesenteroides</i> (1), <i>Leuconostoc pseudomesenteroides</i> (1), <i>Kodamaea ohmeri</i> (1) e espectros incompatíveis (1)
Queijo Minas artesanal 22 dias de maturação (7)	<i>Lactobacillus brevis</i> (1), <i>Lactobacillus plantarum</i> (1), <i>Leuconostoc mesenteroides</i> (2), espectros incompatíveis (2) e sem formação de espectros (1)
Queijo Minas artesanal 60 dias de maturação (4)	<i>Lactobacillus curvatus</i> (1), <i>Leuconostoc citreum</i> (1), <i>Leuconostoc mesenteroides</i> (1) e sem formação de espectros (1)

A identificação dessas colônias, por meio da espectrometria de massas MALDI-TOF, confirmou que 53 isolados (75,7 %) eram BAL dos gêneros *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc* e *Enterococcus*. Essas identificações permitem que as amostras de BAL possam, posteriormente, ser submetidas a outros estudos, como testes de inibição de micro-organismos indesejáveis e avaliação do potencial probiótico.

Os gêneros detectados foram compatíveis aos observados em outros trabalhos sobre identificação de BAL em leite cru e queijos (Karakas-Sen e Karakas, 2018; Camargo *et al.*, 2021). Sant'Anna *et al.* (2017) observaram que BAL isoladas da silagem, água, leite cru, soro-fermento e QMA provenientes de queijarias do Campo das Vertentes e, identificadas por sequenciamento do gene rRNA 16S, pertenciam principalmente aos gêneros *Lactobacillus* e *Pediococcus*.

Quatro amostras (5,7 %) foram identificadas como leveduras: duas colônias de *Candida parapsilosis* e de *Kodamaea ohmeri*. O ágar MRS, comumente usado para contagem de BAL, tem como principal mecanismo de seleção o desenvolvimento de acidez. Entretanto, leveduras podem tolerar ambientes ácidos e também se desenvolver no ágar MRS. Por essa razão, alguns autores adicionam substâncias ao meio, como cicloheximida, para inibir o crescimento de eucariontes (Meroth *et al.*, 2003). As duas colônias identificadas de *C. parapsilosis* foram provenientes das superfícies de prateleiras de maturação. Settanni *et al.* (2021) destacaram a capacidade de leveduras em desenvolver biofilmes.

Não foram detectados espectros de impressão digital em massa de peptídeos de seis colônias (8,6 %), impossibilitando a identificação. Da mesma forma, os espectros formados durante a análise por espectrometria de massas MALDI-TOF de sete colônias (10 %) não apresentaram perfil compatível aos espectros contidos no banco de dados do equipamento, impossibilitando a identificação. Nesse sentido, Böhme *et al.* (2012) destacaram a importância do desenvolvimento e compartilhamento de banco de dados para ampliar o potencial de identificação microbiana da técnica de espectrometria de massas MALDI-TOF, uma vez que a técnica era primordialmente utilizada para identificação de espécimes clínicas de interesse em saúde.

Os micro-organismos identificados foram cadastrados com o código “A56D9A9” no Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado (SisGen).

#### **5.10. Extensão rural**

Os resultados obtidos nas análises microbiológicas e físico-químicas de água, soro-fermento, leite cru, *swabs* e QMA, nas épocas da chuva e da seca, foram apresentados e discutidos junto aos produtores de queijos que participaram do estudo.

Na ocasião, foi realizada uma apresentação demonstrando os resultados gerais e uma discussão sobre os principais procedimentos que poderiam ter levado às falhas higiênico-sanitárias na obtenção dos insumos e na elaboração e manipulação dos queijos.

Também foi realizada a apresentação e discussão individual dos resultados, de forma sigilosa, com cada produtor. Com isso, foi possível abordar de forma detalhada e precisa as dificuldades de cada produtor em adequar os resultados dos parâmetros das amostras aos valores determinados pela legislação. A discussão individual também possibilitou a abordagem específica de possíveis inadequações durante o processo de elaboração dos queijos, bem como propor alterações visando minimizá-las.

Por fim, foi organizado um dia de campo intitulado como “Uma tarde com o QMA” (ANEXO IV), aberto a todos os produtores e técnicos da região. O evento contou com a realização de estações técnicas que abordaram temas como obtenção higiênica do leite, boas práticas de fabricação durante elaboração e maturação de queijos artesanais e processos de higienização de equipamentos e utensílios. O dia de campo foi finalizado com uma palestra sobre a qualidade microbiológica de QMA, realizada pelo IMA.

## 6. CONCLUSÕES

A qualidade da água das queijarias produtoras de QMA de Campo das Vertentes não foi significativamente influenciada pela época do ano. O teor de cloro residual foi o parâmetro para o qual, legalmente, os produtores demonstraram maior dificuldade em atender. As mesmas amostras isentas de cloro residual demonstraram inadequada qualidade microbiológica.

Os parâmetros pesquisados do soro-fermento, com exceção da contagem de *Staphylococcus* coagulase positivo, não foram estatisticamente diferentes entre as épocas da chuva e da seca. Embora a microbiota do soro-fermento tenha um predomínio de BAL, detectou-se a presença de micro-organismos de interesse higiênico-sanitário, mesmo considerando o ambiente ácido e salino observado nesse meio.

Em relação aos parâmetros do leite cru, contagens de *Staphylococcus* spp. e *Staphylococcus* coagulase positivo e valores de acidez titulável e pH foram significativamente diferentes entre as estações do ano. Em geral, as amostras atenderam aos limites preconizados pela legislação, exceto pela contagem de *S. aureus*.

BAL estava presente em elevadas quantidades na superfície das bancadas de produção. Entretanto, também foram detectados coliformes e *Staphylococcus* spp. nesses locais. Em relação as prateleiras de maturação, embora os coliformes não tenham sido detectados, os *Staphylococcus* spp. se mostraram como o micro-organismos com maior contagem, seguido pelas BAL.

A estação do ano não foi um fator capaz de alterar significativamente a qualidade físico-química e microbiológica dos queijos. Apesar da ausência de diferenças estatísticas, na prática foi observado que os resultados dos queijos produzidos na época da chuva apresentaram mais dificuldades em adequar padrões microbiológicos como coliformes a 30 °C e a 45 °C. No período seco, os maiores empecilhos para essa adequação foram o teor de umidade e a contagem de *Staphylococcus* coagulase positivo.

Também, não foi observada influência significativa da maturação sobre os parâmetros microbiológicos dos queijos, embora o percentual de amostras adequadas à legislação aumentasse com o avanço da maturação. Por outro lado, a maturação exerceu efeito estatisticamente significativo sobre os parâmetros físico-químicos dos queijos ao considerar a redução do teor de umidade, aumento dos teores dos componentes sólidos e elevação da acidez titulável.

No geral, os resultados de qualidade dos queijos apresentaram conformidade aos valores determinados pela legislação aos 60 dias de maturação no período chuvoso e 22 dias no período seco.

## 7. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados obtidos no trabalho destacaram que os produtores tiveram dificuldades em adequar os resultados das análises microbiológicas e físico-químicas dos queijos à legislação, quando se considera a possibilidade de propor a redução do período mínimo de maturação do QMA do Campo das Vertentes.

Em geral a água, o soro-fermento e o leite cru apresentaram qualidade desejável. Entretanto, fatores além da qualidade da matéria-prima como a adoção às boas práticas de fabricação e a higienização de superfícies relacionadas à produção de queijos podem ter contribuído para a recontaminação dos produtos durante a maturação.

Na análise individual das queijarias é possível observar que existe o potencial de atender tais padrões em período inferior aos 22 dias de maturação. Embora o trabalho possa não fundamentar uma possível solicitação de redução do período mínimo de maturação, ele permite apurar quais os pontos durante a maturação estão associados às recontaminações e, consequentemente, impedindo que os resultados das análises dos queijos estejam conformes à legislação mais precocemente. Determinar tais correções contribui para que os produtores elaborem queijos com melhor qualidade microbiológica e físico-química e, assim, possam atingir a meta de reduzir o período mínimo de maturação.

Além disso, a realização da pesquisa resultou na formação de um banco de bactérias que podem ser futuramente exploradas em novos estudos. BAL isoladas das amostras de soro-fermento, de leite cru e de queijos podem ser estudadas quanto a um potencial probiótico *in vivo* e *in vitro*; e quanto sua utilização tecnológica na produção de derivados lácteos fermentados. As amostras de *Staphylococcus* coagulase positivo podem ser submetidas às técnicas moleculares para a pesquisa de genes produtores de enterotoxinas. Da mesma forma, também pode-se pesquisar os mecanismos relacionados à formação de biofilmes nos micro-organismos isolados das bancadas de produção e das prateleiras de maturação.

Em síntese, esta pesquisa permitiu maior conhecimento das prováveis falhas higiênico-sanitárias da produção e da manipulação ao longo da maturação do QMA do Campo das Vertentes. As informações obtidas são de grande valia aos produtores que, a partir delas, podem adotar novas estratégias que visem minimizar a ocorrência de eventos que impedem a redução do tempo de maturação dos queijos para atender às exigências sanitárias estabelecidas pela legislação em vigor.

## 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ACURCIO, L. B.; SANDES, S. H. C.; BASTOS, R. W. et al. Milk fermented by *Lactobacillus* species from Brazilian artisanal cheese protect germ-free-mice against *Salmonella* Typhimurium infection. *Benef. Microbes*, v. 8, n. 4, p. 579-588, 2017.
- ADDIS, M., FIORI, M., RIU, G. et al. Physico-chemical characteristics and acidic profile of PDO Pecorino Romano cheese: Seasonal variation. *Small Ruminant Res.*, v. 126, p. 73-79, 2015.
- ALIZADEH, A. M.; MASHAYEKH, M.; BANIKHADEMI, S. et al. Microbial and chemical parameters of traditional Siahmazgi cheese produced in Zanzan province, Iran. *Adv. Anim. Vet. Sci.*, v. 7, n. 1, p. 38-44, 2019.
- ALLAION, J. R.; BARRIONUEVO, K. G.; BURGOS, M. J. G. et al. *Staphylococcus aureus* from Minas Artisanal Cheeses: Biocide Tolerance, Antibiotic Resistance and Enterotoxin Genes. *Appl. Sci.*, v. 12, n. 3, p. 1019, 2022.
- AMARAL, L. A.; ROSSI JÚNIOR, O. D.; NADER FILHO, A. et al. Ocorrência de *Staphylococcus* sp. em água utilizada em propriedades leiteiras do estado de São Paulo. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v. 55, n. 5, p. 620-623, 2003.
- AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. 21st ed. Aed. Am. Public Health Assoc., Washington, DC. 2005. 1274p.
- ANDRADE, A. P. C.; FIGUEIREDO, E. A. T.; FATIMA BORGES, M. et al. Diversity of *Staphylococcus* coagulase-positive and negative strains of coalho cheese and detection of enterotoxin encoding genes. *Bol. Cent. Pesqui. Process. Aliment.*, v. 36, n. 1, 2019.
- ANDRADE, R. P.; MELO, C. N.; GENISHEVA, Z. et al. Yeasts from Canastra cheese production process: Isolation and evaluation of their potential for cheese whey fermentation. *Food Res. Int.*, v. 91, p. 72-79, 2017.
- ANDREWS, W. H.; FLOWERS, R. S.; SILLIKER J. et al. *Salmonella*. Em: DOWNES, F. P.; ITO, K. *Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods*. 4 ed. Washington, DC: American Public Health Association, p. 357-376, 2001.
- ANELLI, P.; HAIDUKOWSKI, M.; EPIFANI, F. et al. Fungal mycobiota and mycotoxin risk for traditional artisan Italian cave cheese. *Food Microbiol.*, v. 78, p. 62-72, 2019.
- ARAGON-ALEGRO, L. C.; LIMA, E. M. F.; PALCICH, G. et al. *Listeria monocytogenes* inhibition by lactic acid bacteria and coliforms in Brazilian fresh white cheese. *Braz. J. Microbiol.*, v. 52, n. 2, p. 847-858, 2021.
- ARTE DO QUEIJO. Mapa do queijo Minas artesanal, 2021. Disponível em: <<https://www.instagram.com/p/COQEFqHhyxr/>>. Acessado em: 26 jan. 2022
- BANJARA, N.; SUHR, M. J.; HALLEN-ADAMS, H. E. Diversity of yeast and mold species from a variety of cheese types. *Curr. Microbiol.*, v. 70, n. 6, p. 792-800, 2015.



BARLOKOVÁ, D.; ILAVSKÝ, J.; KAPUSTA, O. *et al.* Importance of calcium and magnesium in water-water hardening. *E&ES*, v. 92, n. 1, p. 012002, 2017.

BENTLEY INSTRUMENT INC. Bactocount 150 Operator's Manual. Chaska: Bentley Instruments Inc.; 2002. 49p.

BENTLEY INSTRUMENTS INC. Bentley 2000 operator's manual. Chaska: Bentley Instruments Inc.; 1998. 79p.

BETTERA, L.; ALINOVI, M.; MONDINELLI, R. *et al.* Ripening of nostrano valtrompia PDO cheese in different storage conditions: Influence on chemical, physical and sensory properties. *Foods*, v. 9, n. 8, p. 1101, 2020.

BISCOLA, V.; CHOISSET, Y.; RABESONA, H. *et al.* Brazilian artisanal ripened cheeses as sources of proteolytic lactic acid bacteria capable of reducing cow milk allergy. *J. Appl. Microbiol.*, v. 125, n. 2, p. 564-574, 2018.

BLAYA, J.; BARZIDEH, Z.; LAPOINTE, G. Symposium review: Interaction of starter cultures and nonstarter lactic acid bacteria in the cheese environment. *J. Dairy Sci.*, v. 101, n. 4, p. 3611-3629, 2018.

BOBBO, T.; RUEGG, P. L.; STOCCO, G. *et al.* Associations between pathogen-specific cases of subclinical mastitis and milk yield, quality, protein composition, and cheese-making traits in dairy cows. *J. Dairy Sci.*, v. 100, n. 6, p. 4868-4883, 2017.

BODKOWSKI, R.; CZYŻ, K.; KUPCZYŃSKI, R. *et al.* Lipid complex effect on fatty acid profile and chemical composition of cow milk and cheese. *J. Dairy Sci.*, v. 99, n. 1, p. 57-67, 2016.

BOGUNIEWICZ-ZABLOCKA, J.; KLOSOK-BAZAN, I.; NADDEO, V. Water quality and resource management in the dairy industry. *Environ. Sci. Pollut. Res. Int.*, v. 26, n. 2, p. 1208-1216, 2019.

BÖHME, K.; FERNÁNDEZ-NO, I. C.; BARROS-VELÁZQUEZ, J. *et al.* Spectra Bank: An open access tool for rapid microbial identification by MALD I-TOF MS fingerprinting. *Electrophoresis*, v. 33, n. 14, p. 2138-2142, 2012.

BORELLI, B. M.; FERREIRA, E. G.; LACERDA, I. C. *et al.* Yeast populations associated with the artisanal cheese produced in the region of Serra da Canastra, Brazil. *World J. Microbiol. Biotechnol.*, v. 22, n. 11, p. 1115-1119, 2006.

BRANDÃO, A. F.; MELLO, J. A. G.; SILVA, L. D. *Diálogos das grandezas do Brasil*. Rio de Janeiro: Dois Mundos, 1943.

BRASIL. Congresso Nacional. Decreto nº 9.918, de 18 jun. 1950. Dispõe sobre a inspeção industrial e sanitária dos produtos de origem animal. *Diário Oficial da República Federativa do Brasil*, Brasília, DF, 19 Dez. 1950. Seção 1, p. 18161. Disponível em: <[http://www.planalto.gov.br/ccivil\\_03/LEIS/L1283.htm](http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/LEIS/L1283.htm)>. Acesso em: 12 jan. 2022.

BRASIL. Congresso Nacional. Lei nº 1.283, de 18 dez. 1950. Dispõe sobre a inspeção industrial e sanitária dos produtos de origem animal. *Diário Oficial da República Federativa do Brasil*, Brasília, DF, 19 Dez. 1950. Seção 1, p. 18161. Disponível em: <[http://www.planalto.gov.br/ccivil\\_03/LEIS/L1283.htm](http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/LEIS/L1283.htm)>. Acesso em: 12 jan. 2022.

BRASIL. Congresso Nacional. Lei nº 13.680, de 14 jul. 2018. Altera a Lei nº 1.283, de 18 de dezembro de 1950, para dispor sobre o processo de fiscalização de produtos alimentícios de origem animal produzidos de forma artesanal. *Diário Oficial da República Federativa do Brasil*, Brasília, DF, 15 Jul. 2018. Seção 1, p. 2. Disponível em: <[http://www.planalto.gov.br/ccivil\\_03/\\_ato2015-2018/2018/Lei/L13680.htm](http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_ato2015-2018/2018/Lei/L13680.htm)>. Acesso em: 12 jan. 2022.

BRASIL. Congresso Nacional. Lei nº 13.860, de 18 jul. 2019. Dispõe sobre a elaboração e a comercialização de queijos artesanais e dá outras providências. *Diário Oficial da República Federativa do Brasil*, Brasília, DF, 19 Jul. 2019. Seção 1, p. 1. Disponível em: <<https://www.in.gov.br/web/dou/-/lei-n-13.860-de-18-de-julho-de-2019-198615138>>. Acesso em: 01 jul. 2022.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 57, 15 dez. 2011. Critérios adicionais para elaboração de queijos artesanais. *Diário Oficial da República Federativa do Brasil*, Brasília, DF, 16 Dez. 2011. Seção 1, p. 23.

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 República Federativa do Brasil*, Brasília, DF, 11 mar. 1996. Seção 1, p. 3977- 3986.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Regulamento da Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal. Aprovado pelo decreto nº 9.013, de 29 mar. 2017. Brasília, 2017.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Regulamento da Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal. Aprovado pelo decreto nº 30.690, de 20 mar. 1952. Brasília, 1952.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Resolução nº 7, de 28 de novembro de 2000. Critérios de funcionamento e de controle da produção de queijarias, para seu relacionamento junto ao serviço de inspeção federal. *Diário Oficial da República Federativa do Brasil*, Brasília, DF, 02 jan. 2001. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/>>. Acessado em: 26 set. 2019.

BRASIL. Ministério da Saúde. Gabinete do Ministro. Portaria GM/MS nº 888, de 4 de maio de 2021. Altera o Anexo XX da Portaria de Consolidação GM/MS nº 5, de 28 de setembro de 2017, para dispor sobre os procedimentos de controle e de vigilância da qualidade da água para consumo humano e seu padrão de potabilidade. *Diário Oficial da República Federativa do Brasil*, Brasília, DF, Seção 1, 07 de maio de 2021, p. 127.

BROOKS, J. C.; MARTINEZ, B.; STRATTON, J. *et al.* Survey of raw milk cheeses for microbiological quality and prevalence of foodborne pathogens. *Food Microbiol.*, v. 31, n. 2, p. 154-158, 2012.

CALAMARI, L.; GOBBI, L.; BANI, P. Improving the prediction ability of FT-MIR spectroscopy to assess titratable acidity in cow's milk. *Food Chem.*, v. 192, p. 477-484, 2016.

CALIFANO, A. N.; BEVILACQUA, A. E. Multivariate analysis of the organic acids content of Gouda type cheese during ripening. *J. Food Compos. Anal.*, v. 13, n. 6, p. 949-960, 2000.

- CAMARGO, A. C.; COSTA, E. A.; FUSIEGER, A. *et al.* Microbial shifts through the ripening of the “Entre Serras” Minas artisanal cheese monitored by high-throughput sequencing. *Food Res. Int.*, v. 139, p. 109803, 2021.
- CAMPOS, A. C.; PUNO-SARMIENTO, J. J.; MEDEIROS, L. P. *et al.* Virulence genes and antimicrobial resistance in *Escherichia coli* from cheese made from unpasteurized milk in Brazil. *Foodborne Pathog. Dis.*, v. 15, n. 2, p. 94-100, 2018.
- CARPINO, S.; RANDAZZO, C. L.; PINO, A. *et al.* Influence of PDO Ragusano cheese biofilm microbiota on flavour compounds formation. *Food Microbiol.*, v. 61, p. 126-135, 2017.
- CARDOSO, V. M.; BORELLI, B. M.; LARA, C. A. *et al.* The influence of seasons and ripening time on yeast communities of a traditional Brazilian cheese. *Food Res. Int.*, v. 69, p. 331-340, 2015.
- CARDOZO, G. M. B. Q.; BARBIERI, M. K.; MORENO, I. *et al.* *Musca domestica L.* as a vector of pathogenic microorganisms in Ultra-Filtered fresh Minas cheese. *Braz. J. Food Technol.*, v. 12, n. 1/4, p. 85-91, 2009.
- CARMO, L. S.; DIAS, R. S.; LINARDI, V. R. *et al.* Food poisoning due to enterotoxigenic strains of *Staphylococcus* present in Minas cheese and raw milk in Brazil. *Food Microbiol.*, v. 19, n. 1, p. 9-14, 2002.
- CARNEIRO, J. O.; CHAVES, A. C. S. D.; STEPHAN, M. P. *et al.* Artisan minas cheese of Serro: proteolysis during ripening. *Heliyon*, v. 6, n. 7, p. e04446, 2020.
- CASTRO, R. D.; OLIVEIRA, L. G.; SANT’ANNA, F. M. *et al.* 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. *J. Dairy Sci.*, v. 99, n. 8, p. 6086-6096, 2016.
- CASTRO, R. D.; PEDROSO, S. H. S. P.; SANDES, S. H. C. *et al.* Virulence factors and antimicrobial resistance of *Staphylococcus aureus* isolated from the production process of Minas artisanal cheese from the region of Campo das Vertentes, Brazil. *J. Dairy Sci.*, v. 103, n. 3, p. 2098-2110, 2020.
- CAVALCANTE, A. B. D.; COSTA, J. M. C. Padronização da tecnologia de fabricação do queijo manteiga. *Rev. Ciênc. Agron.*, v. 36, n. 2, p. 215-220, 2005.
- CAVALCANTE, J. F. M.; ANDRADE, N. D.; FURTADO, M. M. *et al.* Processamento do queijo coalho regional empregando leite pasteurizado e cultura láctica endógena. *Ciênc. Tecnol. Aliment.*, v. 27, n. 1, p. 205-214, 2007.
- CERUTTI, W. G.; VIEGAS, J.; BARBOSA, A. M. *et al.* Fatty acid profiles of milk and Minas frescal cheese from lactating grazed cows supplemented with peanut cake. *J. Dairy Res.*, v. 83, n. 1, p. 42, 2016.
- CHAIBENJAWONG, P.; FOSTER, S. J. Desiccation tolerance in *Staphylococcus aureus*. *Arch. Microbiol.*, v. 193, n. 2, p. 125-135, 2011.

- CHRISTOPHORIDIS, C.; KOSMA, A.; EVGENAKIS, E. *et al.* Determination of heavy metals and health risk assessment of cheese products consumed in Greece. *J. Food Compos. Anal.*, v. 82, p. 103238, 2019.
- CIPOLAT-GOTET, C.; CECCHINATO, A.; MALACARNE, M. *et al.* Variations in milk protein fractions affect the efficiency of the cheese-making process. *J. Dairy Sci.*, v. 101, n. 10, p. 8788-8804, 2018.
- COPETTI, M. V. Yeasts and molds in fermented food production: an ancient bioprocess. *Curr. Opin. Food Sci.*, v. 25, p. 57-61, 2019.
- COSTA, A.; LOPEZ-VILLALOBOS, N.; SNEDDON, N. W. *et al.* Invited review: Milk lactose—Current status and future challenges in dairy cattle. *J. Dairy Sci.*, v. 102, n. 7, p. 5883-5898, 2019.
- COSTA JÚNIOR, L. C. G.; MORENO, V. J.; MAGALHÃES, F. A. R. *et al.* Maturação do Queijo Minas Artesanal da Microrregião Campo das Vertentes e os efeitos dos períodos seco e chuvoso. *Rev. Inst. Laticínios Cândido Tostes*, v. 69, n. 2, p. 111-120, 2014.
- COSTANZO, N.; CENITL, C.; SANTORO, A. *et al.* Foodborne pathogen assessment in raw milk cheeses. *Int. J. Food Sci.*, v. 2020, 2020.
- COSTARD, S.; ESPEJO, L.; GROENENDAAL, H. *et al.* Outbreak-related disease burden associated with consumption of unpasteurized cow's milk and cheese, United States, 2009–2014. *Emerg. Infect. Dis.*, v. 23, n. 6, p. 957, 2017.
- CURRIE, A.; GALANIS, E.; CHACON, P. A. *et al.* Outbreak of *Escherichia coli* O157: H7 infections linked to aged raw milk Gouda cheese, Canada, 2013. *J. Food Prot.*, v. 81, n. 2, p. 325-331, 2018.
- DORES, M. T.; FERREIRA, C. L. L. F. Queijo Minas artesanal, tradição centenária: ameaças e desafios. *Rev. Bras. Agropecu. Sustent.*, v.2, n.2., p.26-34, 2012.
- EDWARDS, J. P.; SPAANS, O. K.; NEAL, M. *et al.* Milk fat payment affects the relative profitability of Jersey and Holstein-Friesian cows at optimal comparative stocking rate. *J. Dairy Sci.*, v. 102, n. 10, p. 9463-9467, 2019.
- EL-BAZ, A. H.; EL-SHERBINI, M.; ABDELKHALEK, A. *et al.* Prevalence and molecular characterization of *Salmonella* serovars in milk and cheese in Mansoura city, Egypt. *J. Adv. Vet. Anim. Res.*, v. 4, n. 1, p. 45-51, 2017.
- EL-GHANY, W. A. A. Salmonellosis: A food borne zoonotic and public health disease in Egypt. *J. Infect. Dev. Ctries.*, v. 14, n. 07, p. 674-678, 2020.
- ELAHI, S.; FUJIKAWA, H. Effects of Lactic Acid and Salt on Enterotoxin A Production and Growth of *Staphylococcus aureus*. *J. Food Sci.*, v. 84, n. 11, p. 3233-3240, 2019.
- ELMONIR, W.; ESSA, H.; EL-TRAS, W. F. Ecology of *Staphylococcus aureus* and its antibiotic resistance genes in dairy farms: Contributing factors and public health implications. *Slov. Vet. Res.*, v. 56, n. Suppl. 22, p. 747-754, 2019.

EMPRESA DE ASSISTÊNCIA TÉCNICA E EXTENSÃO RURAL DE MINAS GERAIS - EMATER. Levantamento da EMATER-MG mostra que Minas Gerais tem 32 mil agroindústrias familiares, 2022. Disponível em: <[https://www.emater.mg.gov.br/portal.do/site-noticias/levantamento-da-emater-mg-mostra-que-minas-gerais-tem-32-mil-agroindustrias-familiares/?flagweb=novosite\\_pagina\\_interna\\_noticia&id=26273](https://www.emater.mg.gov.br/portal.do/site-noticias/levantamento-da-emater-mg-mostra-que-minas-gerais-tem-32-mil-agroindustrias-familiares/?flagweb=novosite_pagina_interna_noticia&id=26273)>. Acesso em: 26 fev. 2022.

EMPRESA DE ASSISTÊNCIA TÉCNICA E EXTENSÃO RURAL DE MINAS GERAIS - EMATER. Queijo Minas Artesanal – Mapa do Queijo. Disponível em: <[http://www.emater.mg.gov.br/portal.cgi?flagweb=site\\_pgn\\_downloads\\_vert&grupo=135&menu=59](http://www.emater.mg.gov.br/portal.cgi?flagweb=site_pgn_downloads_vert&grupo=135&menu=59)>. Acesso em: 15 jun. 2019.

EMPRESA DE ASSISTÊNCIA TÉCNICA E EXTENSÃO RURAL DE MINAS GERAIS - EMATER. Queijo Minas Artesanal dos Campos das Vertentes. 2016. Disponível em: <<https://bit.ly/3L0MqZ4>>. Acesso em: 27 jan. 2021.

ETTER, D.; CORTI, S.; SPIRIG, S. *et al.* *Staphylococcus aureus* population structure and genomic profiles in asymptomatic carriers in Switzerland. *Front. Microbiol.*, v. 11, p. 1289, 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. 119 p. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

FINAZZI, G.; FILIPELLO, V.; BERTOLETTI, I. *et al.* Foodborne outbreak of gastroenteritis caused by Staphylococcal enterotoxin in Northern Italy. *Eur. J. Public Health*, v. 28, n. suppl\_4, p. cky218. 124, 2018.

FLEMMING, H. C.; WINGENDER, J.; SZEWZYK, U. *et al.* Biofilms: an emergent form of bacterial life. *Nat. Rev. Microbiol.*, v. 14, n. 9, p. 563, 2016.

FRIEDRICZEWSKI, A. B.; GANDRA, E.A.; CONCEIÇÃO, R.C.S. *et al.* Biofilm Formation by Coagulase-Positive *Staphylococcus aureus* Isolated from Mozzarella Cheese Elaborated with Buffalo Milk and its Effect on Sensitivity to Sanitizers. *Acta Sci. Vet.*, v. 46, n. 1, p. 6, 2018.

FONTENELE, M. A.; BASTOS, M. S. R.; SANTOS, K. M. *et al.* Peptide profile of Coalho cheese: A contribution for Protected Designation of Origin (PDO). *Food Chem.*, v. 219, p. 382-390, 2017.

FRÖHLICH-WYDER, M. T.; ARIAS-ROTH, E.; JAKOB, E. Cheese yeasts. *Yeast*, v. 36, n. 3, p. 129-141, 2019.

GALIÉ, S.; GARCÍA-GUTIÉRREZ, C.; MIGUÉLEZ, E. M. *et al.* Biofilms in the food industry: health aspects and control methods. *Front. Microbiol.*, v. 9, p. 898, 2018.

GALINARI, É.; NÓBREGA, J. E. D.; ANDRADE, N. J. D. *et al.* Microbiological aspects of the biofilm on wooden utensils used to make a Brazilian artisanal cheese. *Braz. J. Microbiol.*, v. 45, n. 2, p. 713-720, 2014.

GAN, H. H.; YAN, B.; LINFORTH, R. S. *et al.* Development and validation of an APCI-MS/GC-MS approach for the classification and prediction of Cheddar cheese maturity. *Food Chem.*, v. 190, p. 442-447, 2016.

- GARCÍA-ESTRADA, C.; MARTÍN, J. F. Biosynthetic gene clusters for relevant secondary metabolites produced by *Penicillium roqueforti* in blue cheeses. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, v. 100, n. 19, p. 8303-8313, 2016.
- GEORGALA, A. Lipolysis profile of some non-European raw milk cheese varieties: a review. *Acta Agric. Slov.*, v. 108, n. 2, p. 103-120, 2017.
- GLINSKA, K.; TKACIKOVA, L. Detection of *icaA* gene encoding the biofilm formation in *S. aureus* isolates. *Folia Vet.*, v. 53, n. 1, p. 10-1, 2009.
- GONZÁLEZ-MARTÍN, M.; CORBERA, J. A.; SUÁREZ-BONNET, A. *et al.* Virulence factors in coagulase-positive staphylococci of veterinary interest other than *Staphylococcus aureus*. *Vet. Q.*, v. 40, n. 1, p. 118-131, 2020.
- GUINÉ, R.; TENREIRO, M.; CORREIA, P. *et al.* Effect of Thistle Ecotype in the Physical-Chemical and Sensorial Properties of Serra da Estrela Cheese. *Int. J. Biol. Food Vet. Agric. Eng.*, v. 9, p. 290-294, 2015.
- GUINEE, T. P. *Protein in cheese and cheese products: Structure-function relationships*. Em: *Advanced dairy chemistry*. Springer, New York, NY, p. 347-415, 2016.
- HELDRICH, K. *Standard solutions and certified reference*. Em: *Official methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemists: food composition: additives: natural contaminants*. 15 ed. Arlington: Association of Official Analytical Chemists, v. 2, p. 640-641, 1990.
- HENNART S. L.; FARAGHER J. Validation report of the Delvotest Delvotest SP NT DA. Performance Tested Method 011101. *J. AOAC Int.* v. 95, n.1, p. 252-260, 2012.
- HIRSHBERG, B.; GERBER, R. B.. Formation of carbonic acid in impact of CO<sub>2</sub> on ice and water. *J. Phys. Chem. Lett.*, v. 7, n. 15, p. 2905-2909, 2016.
- HOFFMANN, W.; LUZZI, G.; STEFFENS, M. *et al.* Salt reduction in film-ripened, semihard Edam cheese. *Int. J. Dairy Technol.*, v. 73, n. 1, p. 270-282, 2020
- HUANG, D.; LIU, Y. Q.; LIANG, Y. *et al.* Isolation and screening of salt-tolerance Lactic acid bacteria strain and study on its characteristic producing lactic acid. *Adv. Mater. Res.*, v. 881, p. 746-750, 2014.
- INTERNATIONAL DAIRY FEDERATION. Cheese and processed cheese: Determination of total solids content. IDF Standard 4A. Bruxelles: IDF, 1982. 7p.
- INTERNATIONAL DAIRY FEDERATION. Cheese: Determination of fat content. Butyrometer for Van Gulik method. IDF Standard 221. Bruxelles: IDF, 2008. 7p.
- INTERNATIONAL DAIRY FEDERATION. Cream and evaporated milk: determination of total solids content. IDF Standard 21B. Bruxelles: IDF, 1987. 5p.
- INTERNATIONAL DAIRY FEDERATION. Milk: Determination of nitrogen content. IDF Standard 20B. Bruxelles: IDF, 1993. 18p.
- INTERNATIONAL DAIRY FEDERATION. Milk and liquid milk products - Guidelines for the application of mid-infrared spectrometry. IDF Standard 148-2. Bruxelles: IDF, 2006. 14p.

INTERNATIONAL DAIRY FEDERATION. Milk and liquid milk products - Guidelines for the application of mid-infrared spectrometry. IDF Standard 141. Bruxelas: IDF, 2013. 14p.

INTERNATIONAL DAIRY FEDERATION. Yogurt: Enumeration of characteristic microorganisms colony count technique at 37°C. IDF Standard 117A. Bruxelas: IDF, 1988. 10p.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA - IBGE. Pesquisa pecuária municipal. 2020. Disponível em: <<https://www.ibge.gov.br/estatisticas/economicas/agricultura-e-pecuaria/9107-producao-da-pecuaria-municipal.html>>. Acesso em: 11 jan. 2022.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA - IBGE. Estado de Minas. Meso e microrregiões do IBGE. 2010b. Disponível em: <[https://www.mg.gov.br/sites/default/files/paginas/arquivos/2016/ligminas\\_10\\_2\\_04\\_listameso\\_micro.pdf](https://www.mg.gov.br/sites/default/files/paginas/arquivos/2016/ligminas_10_2_04_listameso_micro.pdf)> Acesso em: 12 jan. 2022.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA - IBGE. Censo Agropecuário 2017. Disponível em: <<https://mapasinterativos.ibge.gov.br/agrocompara>> Acesso em: 12 jan. 2022.

INSTITUTO DO PATRIMÔNIO HISTÓRICO E ARTÍSTICO NACIONAL – IPHAN. Modo Artesanal de Fazer Queijo de Minas. 2014. Disponível em: <[http://portal.iphan.gov.br/uploads/publicacao/Dossie\\_Queijo\\_de\\_Minis\\_web.pdf](http://portal.iphan.gov.br/uploads/publicacao/Dossie_Queijo_de_Minis_web.pdf)> Acesso em: 03 abr. 2022.

INSTITUTO NACIONAL DE METEOROLOGIA - INMET. Disponível em: [http://www.inmet.gov.br/portal/index.php?r=home/page&page=rede\\_estacoes\\_auto\\_graf](http://www.inmet.gov.br/portal/index.php?r=home/page&page=rede_estacoes_auto_graf). Acesso em: 20 out. 2021.

IPSEN, R. Microparticulated whey proteins for improving dairy product texture. *Int. Dairy J.*, v. 67, p. 73-79, 2017.

ISMAIL, R.; AVIAT, F.; GAY-PERRET, P. *et al.* An assessment of *L. monocytogenes* transfer from wooden ripening shelves to cheeses: Comparison with glass and plastic surfaces. *Food Control*, v. 73, p. 273-280, 2017.

JAMAL, M.; AHMAD, W.; ANDLEEB, S. *et al.* Bacterial biofilm and associated infections. *J. Chin. Med Assoc.*, v. 81, n. 1, p. 7-11, 2018.

JAMAS, L. T.; SALINA, A.; ROSSI, R. *et al.* Quality parameters of bovine milk from family farms. *Pesqui. Vet. Bras.*, v. 38, n. 4, p. 573-578, 2018.

JANG, J.; HUR, H. G.; SADOWSKY, M. J. *et al.* Environmental *Escherichia coli*: ecology and public health implications—a review. *J. Appl. Microbiol.*, v. 123, n. 3, p. 570-581, 2017.

JOHLER, S.; WEDER, D.; BRIDY, C. *et al.* Outbreak of staphylococcal food poisoning among children and staff at a Swiss boarding school due to soft cheese made from raw milk. *J. Dairy Sci.*, v. 98, n. 5, p. 2944-2948, 2015.

JONES, G.; LEFÈVRE, S.; DONGUY, M. P. *et al.* Outbreak of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) O26 paediatric haemolytic uraemic syndrome (HUS) cases associated with the consumption of soft raw cow's milk cheeses, France, March to May 2019. *Euro Surveill.*, v. 24, n. 22, 2019.

JUAN, B.; QUEVEDO, J. M.; ZAMORA, A. *et al.* Lipolysis of cheeses made from goat milk treated by ultra-high pressure homogenization. *LWT - Food Sci. Technol.*, v. 60, n. 2, p. 1034-1038, 2015.

KAMIMURA, B. A.; CABRAL, L.; NORONHA, M. F. *et al.* Amplicon sequencing reveals the bacterial diversity in milk, dairy premises and Serra da Canastra artisanal cheeses produced by three different farms. *Food Microbiol.*, v. 89, p. 103453, 2020.

KAMIMURA, B. A.; DE FILIPPIS, F.; SANT'ANA *et al.* Large-scale mapping of microbial diversity in artisanal Brazilian cheeses. *Food microbiology*, v. 80, p. 40-49, 2019.

KARAKAS-SEN, A.; KARAKAS, E. Isolation, identification and technological properties of lactic acid bacteria from raw cow milk. *Biosci. J. (Online)*, p. 385-399, 2018.

KHATTAB, A. R.; GUIRGUIS, H. A.; TAWFIK, S. M. *et al.* Cheese ripening: A review on modern technologies towards flavor enhancement, process acceleration and improved quality assessment. *Trends Food Sci. Technol.*, v. 88, p. 343-360, 2019.

KORNACKI, J. L.; JOHNSON J. L. *Enterobacteriaceae, coliforms and Escherichia coli as quality and safety indicators*. In: DOWNES, F. P.; ITO, K. *Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods*. 4 ed. Washington, DC: American Public Health Association, p. 69–80, 2001.

KUKHTYN, M. D.; KOVALENKO, V. L.; POKOTYLO, O. S. *et al.* Staphylococcal contamination of raw milk and handmade dairy products, which are realized at the markets of Ukraine. *J. Vet. Med. Biotechnol. Biosafety*, n. 3, Iss. 1, p. 12-16, 2017.

KÜMMEL, J.; STESSL, B.; GONANO, M. *et al.* *Staphylococcus aureus* entrance into the dairy chain: tracking *S. aureus* from dairy cow to cheese. *Front. Microbiol.*, v. 7, p. 1603, 2016.

LANCETTE, G. A.; TATINI S. R. *Staphylococcus aureus*. Em: DOWNES, F. P.; ITO, K. *Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods*. 4 ed. Washington, DC: American Public Health Association, p. 387–400, 2001.

LANDETE, J. M. A review of food-grade vectors in lactic acid bacteria: from the laboratory to their application. *Crit. Rev. Biotechnol.*, v. 37, n. 3, p. 296-308, 2017.

LARSEN, M. K.; NIELSEN, J. H.; BUTLER, G. *et al.* Milk quality as affected by feeding regimens in a country with climatic variation. *J. Dairy Sci.*, v. 93, n. 7, p. 2863-2873, 2010.

LEVKOV, V.; STAFILOV, T.; PACINOVSKI, N. *et al.* The content of macro and trace elements in curd and traditional white brined cheese. *Vet. Zootech-Lith.*, v. 75, n. 97, 2017.

LI, N.; WANG, Y.; YOU, C. *et al.* Variation in raw milk microbiota throughout 12 months and the impact of weather conditions. *Sci. Rep.*, v. 8, n. 1, p. 1-10, 2018.

LIMA, C. D. L. C.; LIMA, L. A.; CERQUEIRA, M. M. O. P. *et al.* Lactic acid bacteria and yeasts associated with the artisanal Minas cheese produced in the region of Serra do Salitre, Minas Gerais. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v. 61, n. 1, p. 266-272, 2009.



- LOBACZ, A.; KOWALIK, J.; ZULEWSKA, J. Determination of the survival kinetics of *Salmonella* spp. on the surface of ripened raw milk cheese during storage at different temperatures. *Int. J. Food Sci.*, v. 55, n. 2, p. 610-618, 2020.
- LOBACZ, A.; ZULEWSKA, J.. Fate of *Salmonella* spp. in the Fresh Soft Raw Milk Cheese during Storage at Different Temperatures. *Microorganisms*, v. 9, n. 5, p. 938, 2021.
- LOPES, M. A.; CARMO, E. A.; LIMA, A. L. R. et al. Análise da rentabilidade de uma empresa com opção de comercialização do queijo ou leite. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v. 58, n. 4, p. 642-647, 2006
- MAHAPATRA, S. S.; SAHU, M.; PATEL, R. K. et al. Prediction of water quality using principal component analysis. *Water Qual. Expos. Health.*, v. 4, n. 2, p. 93-104, 2012.
- MALIK, T. A.; MOHINI, M.; MIR, S. H. et al. Somatic cells in relation to udder health and milk quality-a review. *J. Anim. Health Prod.*, v. 6, n. 1, 2018.
- MANUELIAN, C. L.; CURRÒ, S.; PENASA, M. et al. Characterization of major and trace minerals, fatty acid composition, and cholesterol content of Protected Designation of Origin cheeses. *J. Dairy Sci.*, v. 100, n. 5, p. 3384-3395, 2017.
- MARTIN, B.; COULON, J. B.; CHAMBA, J. F. et al. Effect of milk urea content on characteristics of matured Reblochon cheeses. *Le lait*, v. 77, n. 4, p. 505-514, 1997.
- MARTIN, N. H.; TRMČIĆ, A.; HSIEH, T. H. et al. The evolving role of coliforms as indicators of unhygienic processing conditions in dairy foods. *Front. Microbiol.*, v. 7, p. 1549, 2016.
- MARTÍNEZ-VASALLO, A.; RIBOT-ENRÍQUEZ, A.; RIVERÓN-ALEMÁN, Y. et al. *Staphylococcus aureus* in the production chain of artisan fresh cheese. *Rev. Salud Anim.*, v. 41, n. 1, 2019.
- MARTINS, J. M. *Características físico-químicas e microbiológicas durante a maturação do queijo Minas Artesanal da região do Serro*. 2006. 158 p. (Doutorado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa-MG.
- MARTINS, J. M.; GALINARI, É.; PIMENTEL-FILHO, N. J. et al. Determining the minimum ripening time of artisanal Minas cheese, a traditional Brazilian cheese. *Braz. J. Microbiol.*, v. 46, n. 1, p. 219-230, 2015.
- MCAULEY, C. M.; SINGH, T. K.; HARO-MAZA, J. F. M. et al. Microbiological and physicochemical stability of raw, pasteurised or pulsed electric field-treated milk. *Innov. Food Sci. Emerg. Technol.*, v. 38, p. 365-373, 2016.
- MCMILLAN, K.; MOORE, S. C.; MCAULEY, C. M. et al. Characterization of *Staphylococcus aureus* isolates from raw milk sources in Victoria, Australia. *BMC Microbiol.*, v. 16, n. 1, p. 169, 2016.
- MEDEIROS, M. D. L.; HORODYSKI, G. S.; PASSADOR, J. L. Food souvenirs in the perception of the tourist: the case of the artisanal minas Serro cheese. *Rev. Bras. Pesq. Tur.*, v. 11, n. 2, p. 347-364, 2017.

MENESES, J. N. C. Queijo artesanal de Minas: patrimônio cultural do Brasil. Dossiê interpretativo. Belo Horizonte: IPHAN, 2006. v.1.

MERCK. *Reactivos, diagnóstica, productos químicos*. Darmstadt, 1993. 1584 p.

MEROTH, C. B.; WALTER, J.; HERTEL, C. *et al.* Monitoring the bacterial population dynamics in sourdough fermentation processes by using PCR-denaturing gradient gel electrophoresis. *Appl. Environ. Microbiol.*, v. 69, n. 1, p. 475-482, 2003.

MINAS GERAIS. Assembleia Legislativa do Estado de Minas Gerais. Decreto nº 42.645, de 5 jun. 2002c. Altera o regulamento da Lei nº 14.185 de 31 de janeiro de 2002 que dispõe sobre o processo de produção de Queijo Minas Artesanal. *Diário do Executivo*. Minas Gerais, Belo Horizonte, 6 jun. 2002 p.18 col.2. Disponível em: <<https://www.almg.gov.br/consulte/legislacao/completa/completa.html?tipo=DEC&num=42645&comp=&ano=2002>>. Acesso em: 12 jan. 2022.

MINAS GERAIS. Assembleia Legislativa do Estado de Minas Gerais. Decreto nº 44.864, de 1 ago. 2008. Altera o regulamento da Lei nº 14.185 de 31 de janeiro de 2002 que dispõe sobre o processo de produção de Queijo Minas Artesanal. *Diário do Executivo*. Minas Gerais, Belo Horizonte, 2 ago. 2008. p.1 col.2. Disponível em: <<https://www.almg.gov.br/consulte/legislacao/completa/completa.html?tipo=DEC&num=44864&comp=&ano=2008>>. Acesso em: 13 jan. 2022.

MINAS GERAIS. Assembleia Legislativa do Estado de Minas Gerais. Decreto nº 48.024, de 19 ago. 2020b. 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. *Diário do Executivo*. Minas Gerais, Belo Horizonte, 20 ago. 2020. p.1 col.1. Disponível em: <<https://www.almg.gov.br/consulte/legislacao/completa/completa.html?tipo=DEC&num=48024&comp=&ano=2020>>. Acesso em: 07 fev. 2022.

MINAS GERAIS. Assembleia Legislativa do Estado de Minas Gerais. Lei nº 14.185, de 31 jan. 2002b. 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. *Diário do Executivo*. Minas Gerais, Belo Horizonte, 01 fev. 2002. p.3 col.2. Disponível em: <<https://www.almg.gov.br/consulte/legislacao/completa/completa.html?tipo=LEI&num=14185&ano=2002>>. Acesso em: 12 jan. 2022.

MINAS GERAIS. Assembleia Legislativa do Estado de Minas Gerais. Lei nº 19.492, de 13 jan. 2011. Altera dispositivos da Lei nº 14.185, de 31 de janeiro de 2002 que dispõe sobre o processo de produção do Queijo Minas Artesanal e dá outras providências. *Diário do Executivo*. Minas Gerais, Belo Horizonte, 14 jan. 2011. p.4 col.1. Disponível em: <<https://www.almg.gov.br/consulte/legislacao/completa/completa.html?num=19492&ano=2011&tipo=LEI>>. Acesso em: 12 jan. 2022.

MINAS GERAIS. Assembleia Legislativa do Estado de Minas Gerais. Lei nº 20.549, de 18 dez. 2012. Dispõe sobre a produção e a comercialização dos queijos artesanais de Minas Gerais. *Diário do Executivo*. Minas Gerais, Belo Horizonte, 19 dez. 2012. p.1 col.2. Disponível em: <<https://www.almg.gov.br/consulte/legislacao/completa/completa.html?num=20549&ano=2012&tipo=LEI>>. Acesso em: 12 jan. 2022.

MINAS GERAIS. Assembleia Legislativa do Estado de Minas Gerais. Lei nº 22.926, de 12 jan. 2018c. Dispõe sobre o Programa de Certificação de Produtos Agropecuários e Agroindustriais - Certifica Minas - e dá outras providências. *Diário do Executivo*. Minas Gerais, Belo Horizonte, 13 jan. 2018. p.6 col.2. Disponível em: <<https://www.almg.gov.br/consulte/legislacao/completa/completa.html?tipo=LEI&num=22926&ano=2018>>. Acesso em: 12 jan. 2022.

MINAS GERAIS. Assembleia Legislativa do Estado de Minas Gerais. Lei nº 23.157, de 18 dez. 2018b. Dispõe sobre a produção e a comercialização dos queijos artesanais de Minas Gerais. *Diário do Executivo*. Minas Gerais, Belo Horizonte, 19 dez. 2018. p.1 col.1. Disponível em: <<https://www.almg.gov.br/consulte/legislacao/completa/completa.html?tipo=LEI&num=23157&comp=&ano=2018>>. Acesso em: 12 jan. 2022.

MINAS GERAIS. Instituto Mineiro de Agropecuária. Lista de produtores certificados - Queijo. 2022c. Disponível em: <[http://www.agricultura.mg.gov.br/certificaminas/website/images/prop\\_certif/Lista\\_de\\_produtores\\_certificados\\_queijo.pdf](http://www.agricultura.mg.gov.br/certificaminas/website/images/prop_certif/Lista_de_produtores_certificados_queijo.pdf)>. Acesso em: 27 jan. 2022.

MINAS GERAIS. Instituto Mineiro de Agropecuária. Portaria nº 546 de 29 out. 2002a. Identifica a microrregião do Serro. Disponível em: <<http://www.ima.mg.gov.br/institucional/portarias>> Acesso em: 11 jan. 2022.

MINAS GERAIS. Instituto Mineiro de Agropecuária. Portaria nº 594 de 10 jun. 2003. Identifica a microrregião de Araxá. Disponível em: <<http://www.ima.mg.gov.br/institucional/portarias>> Acesso em: 11 jan. 2022.

MINAS GERAIS. Instituto Mineiro de Agropecuária. Portaria nº 694 de 17 nov. 2004. Identifica a microrregião da Canastra. Disponível em: <<http://www.ima.mg.gov.br/institucional/portarias>> Acesso em: 11 jan. 2022.

MINAS GERAIS. Instituto Mineiro de Agropecuária. Portaria nº 874 de 8 out. 2007. Altera a denominação da microrregião do Alto Paranaíba como produtora do queijo Minas artesanal. Disponível em: <<http://www.ima.mg.gov.br/institucional/portarias>>. Acesso em: 11 jan. 2022.

MINAS GERAIS. Instituto Mineiro de Agropecuária. Portaria nº 1.022 de 3 nov. 2009. Identifica a região de Campo das Vertentes. Disponível em: <<http://www.ima.mg.gov.br/institucional/portarias>>. Acesso em: 11 jan. 2022.

MINAS GERAIS. Instituto Mineiro de Agropecuária. Portaria nº 1.305 de 30 abr. 2013. Estabelece diretrizes para a produção do Queijo Minas Artesanal. Disponível em: <<http://www.ima.mg.gov.br/institucional/portarias>>. Acesso em: 11 jan. 2022.> Acesso em: 12 jan. 2022.

MINAS GERAIS. Instituto Mineiro de Agropecuária. Portaria nº 1.397 de 13 fev. 2014a. Identifica a Microrregião do Triângulo Mineiro como produtora de Queijo Minas Artesanal. Disponível em: <<http://www.ima.mg.gov.br/institucional/portarias>> Acesso em: 11 jan. 2022.

MINAS GERAIS. Instituto Mineiro de Agropecuária. Portaria nº 1.428 de 29 ago. 2014b. Identifica a microrregião da Serra do Salitre como produtora do Queijo Minas Artesanal. Disponível em: <<http://www.ima.mg.gov.br/institucional/portarias>> Acesso em: 11 jan. 2022.

MINAS GERAIS. Instituto Mineiro de Agropecuária. Portaria nº 1.736 de 27 jul. 2017. Altera a Portaria nº 1305/2013, de 30 de abril de 2013, que dispõe sobre o período de maturação do Queijo Minas Artesanal. Disponível em: <<http://www.ima.mg.gov.br/institucional/portarias>>. Acesso em: 11 jan. 2022.

MINAS GERAIS. Instituto Mineiro de Agropecuária. Portaria nº 1.837 de 05 jul. 2018d. Dispõe sobre os parâmetros e padrões físico-químico e microbiológicos de alimentos de origem animal e água de abastecimento e revoga a Portaria IMA Nº 1651, de 29 de agosto de 2016 e Portaria IMA Nº 1670, de 29 de outubro de 2016. Disponível em: <[http://ima.mg.gov.br/index.php?preview=1&option=com\\_dropfiles&format=&task=frontfile.download&catid=1349&id=14428&Itemid=1000000000000](http://ima.mg.gov.br/index.php?preview=1&option=com_dropfiles&format=&task=frontfile.download&catid=1349&id=14428&Itemid=1000000000000)> Acesso em: 03 jul. 2022.

MINAS GERAIS. Instituto Mineiro de Agropecuária. Portaria nº 1.859 de 31 ago. 2018a. Institui e regulamenta a certificação de queijos artesanais no âmbito do Programa Certifica Minas. Disponível em: <<http://www.ima.mg.gov.br/institucional/portarias>> Acesso em: 12 jan. 2022.

MINAS GERAIS. Instituto Mineiro de Agropecuária. Portaria nº 1.937 de 14 ago. 2019. Dispõe sobre a habilitação sanitária dos queijos artesanais e da concessão do selo Arte às queijarias com habilitação sanitária no IMA. Disponível em: <<http://www.ima.mg.gov.br/institucional/portarias>> Acesso em: 13 jan. 2022.

MINAS GERAIS. Instituto Mineiro de Agropecuária. Portaria nº 2.016 de 26 nov. 2020a. Identifica a Região Serras da Ibitipoca como Produtora do Queijo Minas Artesanal e Revoga a Portaria IMA nº 1834, de 04 de julho de 2018. Disponível em: <[http://www.ima.mg.gov.br/portarias/doc\\_details/1686-portaria-no-1022-de-03-de-novembro-de-2009](http://www.ima.mg.gov.br/portarias/doc_details/1686-portaria-no-1022-de-03-de-novembro-de-2009)>. Acesso em: 29 ago. 2018.

MINAS GERAIS. Instituto Mineiro de Agropecuária. Portaria n. 2.051 de 7 abr. 2021. Define o período de Maturação do Queijo Minas Artesanal produzido nas microrregiões de Araxá, Campo das Vertentes, Canastra, Cerrado, Serra do Salitre, Serro e Triângulo Mineiro. Disponível em: <<http://www.ima.mg.gov.br/institucional/portarias>>. Acesso em: 03 abr. 2022.

MINAS GERAIS. Instituto Mineiro de Agropecuária. Portaria n. 2.129 de 26 mar. 2022a. Identifica a Região de Diamantina como produtora de Queijo Minas Artesanal. Disponível em: <<https://www.jornalminasgerais.mg.gov.br/?dataJornal=2022-03-26>>. Acesso em: 11 jan. 2022.

MINAS GERAIS. Instituto Mineiro de Agropecuária. Portaria n. 2.141 de 19 abr. 2022b. Identifica a Região Entre Serras da Piedade ao Caraça como produtora de Queijo Minas Artesanal. Disponível em: <<http://ima.mg.gov.br/files/1829/Ano-2022/19230/Portaria-n%C2%BA-2141,-de-19-de-abril-de-2022.pdf>>. Acesso em: 01 jul. 2022.

MINAS GERAIS. Instituto Mineiro de Agropecuária. Queijos artesanais. 2022d. Disponível em: <<http://www.ima.mg.gov.br/agroindustria/queijos-artesanais>>. Acesso em: 27 jan. 2022.

MINAS GERAIS. *Perfil do produtor de leite nas mesorregiões da Zona da Mata e Campo das Vertentes de Minas Gerais*. Belo Horizonte: INAES, 2010. 119 p.

MONTEL, M. C.; BUCHIN, S.; MALLET, A. *et al.* Traditional cheeses: rich and diverse microbiota with associated benefits. *Int. J. Food Microbiol.*, v. 177, p. 136-154, 2014.

- MORADI, M.; OMER, A. K.; RAZAVI, R. *et al.* The relationship between milk somatic cell count and cheese production, quality and safety: A review. *Int. Dairy J.*, v. 113, p. 104884, 2021.
- MORANDI, S.; SILVETTI, T.; BATTELLI, G. *et al.* Can lactic acid bacteria be an efficient tool for controlling *Listeria monocytogenes* contamination on cheese surface? The case of Gorgonzola cheese. *Food Control*, v. 96, p. 499-507, 2019.
- MORENO, V. J. *Caracterização física e físico-química do queijo Minas artesanal da microrregião Campo das Vertentes*. 2013. 131f. Dissertação (Mestrado Profissional em Ciência e Tecnologia do Leite e Derivados) – Faculdade de Farmácia e Bioquímica, Universidade Federal de Juíz de Fora, Juíz de Fora, MG.
- MORTON, R. D. Aerobic plate count. Em: . Em: DOWNES, F. P.; ITO, K. *Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods*. 4 ed. Washington, DC: American Public Health Association, p. 63–67, 2001.
- MUGAMPOZA, D.; GKATZIONIS; K., SWIFT, B. *et al.* Diversity of *Lactobacillus* species of stilton cheese relates to site of isolation. *Front. Microbiol.*, v. 11, p. 904, 2020.
- MULLAN, W. M. A. Causes and control of early gas production in cheddar cheese. *Int. J. Dairy Technol.*, v. 53, n. 2, p. 63-68, 2000.
- MUKHERJEE, N.; NOLAN, V. G.; DUNN, J. R. *et al.* Sources of human infection by *Salmonella enterica* serotype Javiana: A systematic review. *PloS one*, v. 14, n. 9, p. e0222108, 2019.
- MURPHY, S. C.; MARTIN, N. H.; BARBANO, D. M. *et al.* Influence of raw milk quality on processed dairy products: How do raw milk quality test results relate to product quality and yield?. *J. Dairy Sci.*, v. 99, n. 12, p. 10128-10149, 2016.
- MURTAZA, M. A.; HUMA, N.; SAMEEN, A. *et al.* Minerals and lactic acid contents in buffalo milk cheddar cheese; a comparison with cow. *J. Food Nutr. Res.*, v. 2, n. 8, p. 465-468, 2014.
- MURUZOVIĆ, M. Ž.; MLADENOVIĆ, K. G.; ČOMIĆ, L. R. *In vitro* evaluation of resistance to environmental stress by planktonic and biofilm form of lactic acid bacteria isolated from traditionally made cheese from Serbia. *Food Biosci.*, v. 23, p. 54-59, 2018.
- NAGOETTE, M.; MILLER, D.; DETTINGER, L. *et al.* Detection and Characterization of *Salmonella* spp. in Raw Commingled Bulk Tank Milk from Dairies in Pennsylvania. *Foodborne Pathog. Dis.*, v. 16, n. 6, p. 434-437, 2019.
- NAN, Z. H. A. N.; HUANG, Y.; ZHU, R. A. O. *et al.* Fast detection of carbonate and bicarbonate in groundwater and lake water by coupled ion selective electrode. *Chinese J. Anal. Chem.*, v. 44, n. 3, p. 355-360, 2016.
- NASCIMENTO, A. L. D.; SOUSA, R. S.; RODRIGUES, A. A. R. *et al.* Detection of virulence factors in coagulase-negative *Staphylococcus* spp. strains isolated from Emmental cheese. *Arq. Inst. Biol.*, v. 87, 2020.
- NERY, F. H.; MACHADO, M. M. M. Análise multifractal da variabilidade espacial pluviométrica no estado de Minas Gerais. *Rev. Ra'e Ga*, v. 45, n. 1, p. 233-249, 2019.

- NETTO, M. M. *A geografia do queijo minas artesanal*. 2011. 420 f. Tese (Doutorado em Geografia) – Instituto de Geociências e Ciências Exatas, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro-SP.
- NINGTYAS, D. W.; BHANDARI, B.; BANSAL, N. *et al.* A tribological analysis of cream cheeses manufactured with different fat content. *Int. Dairy J.*, v. 73, p. 155-165, 2017.
- NYAMAKWERE, F.; ESPOSITO, G.; DZAMA, K. *et al.* A review of artisanal cheese making: An African perspective. *S. Afr. J. Anim. Sci.*, v. 51, n. 3, p. 296-309, 2021.
- OFORI, I.; MADDILA, S.; LIN, J. *et al.* Chlorine dioxide oxidation of *Escherichia coli* in water—A study of the disinfection kinetics and mechanism. *J. Environ. Sci. Heal. A*, v. 52, n. 7, p. 598-606, 2017.
- 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. 111 p. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.
- OLIVEIRA, S. P. P.; MARTINS, J. M.; NOGUEIRA, C. H. *et al.* Physical-chemical characteristics of artisanal Minas cheese of the Serro with pingo and with rala. *Rev. Inst. Laticínios Cândido Tostes*, v. 73, n. 4, p. 235-244, 2018.
- OZTURKOGLU-BUDAK, S.; GURSOY, A.; AYKAS, D. P. *et al.* Volatile compound profiling of Turkish Divle Cave cheese during production and ripening. *J. Dairy Sci.*, v. 99, n. 7, p. 5120-5131, 2016.
- PAGTHINATHAN, M.; NAFEES, M. S. M. Biochemistry of cheese ripening. *J. Agric. Sci.*, v. 10, p. 16-26, 2015.
- PENNA, A. L. B.; GIGANTE, M. L.; TODOROV, S. D. Artisanal Brazilian Cheeses—History, Marketing, Technological and Microbiological Aspects. *Foods*, v. 10, n. 7, p. 1562, 2021.
- PEREIRA, D. A.; PAIVA, P. H. C.; PAIVA, É. C. F. *et al.* Caracterização dos sistemas de abastecimento de água de queijarias da microrregião Campo das Vertentes. *Rev. Inst. Latic. Cândido Tostes*, v. 69, n. 4, p. 258-267, 2014.
- PERCIVAL, S. L.; MALIC, S.; CRUZ, H. *et al.* *Introduction to biofilms*. Em: *Biofilms and veterinary medicine*. Springer, Berlin, Heidelberg, p. 41-68 2011.
- PICININ, L. C. A.; BORDIGNON-LUIZ, M. T.; CERQUEIRA, M. M. O. P. *et al.* Effect of seasonal conditions and milk management practices on bulk milk quality in Minas Gerais State-Brazil. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v. 71, n. 4, p. 1355-1363, 2019.
- PINEDA, A. P. A.; CAMPOS, G. Z.; PIMENTEL-FILHO, N. J. *et al.* Brazilian artisanal cheeses: diversity, microbiological safety, and challenges for the sector. *Front. Microbiol.*, v. 12, p. 732, 2021.
- PINILLA, A. M. A.; CORNEJO, B. G.; MÉNDEZ, J. A. P. *et al.* The profitability of value-added products in dairy farm diversification initiatives. *Span. J. Agric. Res.* v. 16, n. 2, p. 1-9, 2018.

PINTO, M. R. M.; TEIXEIRA, M. F.; SARMENTO, R. C. *et al.* Avaliação microbiológica de queijo do Marajó tipo creme, de leite de búfala, elaborado em queijarias da Ilha do Marajó, Pará. *Scientia Plena*, v. 12, n. 6, 2016.

RADHAKRISHNAN, A.; ALS, D.; MINTZ, E. D. *et al.* Introductory article on global burden and epidemiology of typhoid fever. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, v. 99, n. 3\_Suppl, p. 4-9, 2018.

RAFAEL, V. D. 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. 158 f. Tese (Doutorado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa-MG.

RAINARD, P.; FOUCRAS, G.; FITZGERALD, J. R. *et al.* Knowledge gaps and research priorities in *Staphylococcus aureus* mastitis control. *Transbound. Emerg. Dis.*, v. 65, p. 149-165, 2018.

RAJKOVIC, A.; JOVANOVIC, J.; MONTEIRO, S. *et al.* Detection of toxins involved in foodborne diseases caused by Gram-positive bacteria. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.*, v. 19, n. 4, p. 1605-1657, 2020.

RAMÍREZ-CASTILLO, F.; LOERA-MURO, A.; JACQUES, M. *et al.* Waterborne pathogens: detection methods and challenges. *Pathogens*, v. 4, n. 2, p. 307-334, 2015.

RAMÓN, A. N.; DE LA VEGA, S. M.; FERRER, E. C. *et al.* Training small producers in Good Manufacturing Practices for the development of goat milk cheese. *Food Sci. Technol.*, v. 38, p. 134-141, 2017.

RESENDE, M. F. S.; COSTA, H. H. S.; ANDRADE, E. H. *et al.* Influence of altitude on lactic acid bacteria population of Minas artisanal cheese from Serra da Canastra. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v. 63, n. 6, p. 1567-1573, 2011.

REZENDE, E. C. *Aspectos sensoriais e microbiológicos do queijo Minas artesanal da microrregião Campo das Vertentes*. 2014. 114 p. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia do Leite e Derivados) – Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora.

ROSAS, C. I. O.; CALDERÓN-EZQUERRO, M. D. C.; GUTIÉRREZ-RUACHO, O. G. Fungal spores and pollen are correlated with meteorological variables: effects in human health at Hermosillo, Sonora, Mexico. *Int. J. Environ. Health Res.*, v. 30, n. 6, p. 677-695, 2020.

SÁ, L. F. C.; MARTINS, J. M.; MARTINS, M. L. *et al.* Qualidade microbiológica do queijo Minas artesanal do Campo das Vertentes. *Braz. J. Dev.*, v. 7, n. 11, p. 110013-110028, 2021.

SADLER, G. D.; MURPHY, P. A. *pH and titratable acidity*. Em: *Food Analysis*. 5th. Boston, MA: Springer, 2010

SAINT-HILAIRE, A. *Viagem às nascentes do rio S. Francisco e pela provincia de Goyaz*. São Paulo: Nacional, 1937.

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. 107 p. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

- SÁNCHEZ-GAMBOA, C.; HICKS-PÉREZ, L.; GUTIÉRREZ-MÉNDEZ, N. *et al.* Microbiological changes during ripening of Chihuahua cheese manufactured with raw milk and its seasonal variations. *Foods*, v. 7, n. 9, p. 153, 2018.
- SANT'ANNA, F. M.; WETZELS, S. U.; CICCIO, S. H. S. *et al.* Microbial shifts in Minas artisanal cheeses from the Serra do Salitre region of Minas Gerais, Brazil throughout ripening time. *Food Microbiol.*, v. 82, p. 349-362, 2019. *J. Dairy Vet. Sci.*, v. 6, n. 2, p.1-3, 2019.
- SANT'ANNA, F. M., ACURCIO, L. B., ALVIM, L. B. *et al.* Assessment of the probiotic potential of lactic acid bacteria isolated from Minas artisanal cheese produced in the Campo das Vertentes region, Brazil. *Int. J. Dairy Technol.*, v. 70, n. 4, p. 592-601, 2017.
- SANTOS FILHO, A. S.; PIRES, C. V.; CARDOSO, W. J. *et al.* Caracterização física e condições sanitárias do comércio de queijo cabacinha em três municípios do Vale do Jequitinhonha, MG, Brasil. *Rev. Inst. Latic. Cândido Tostes*, v. 71, n. 4, 2016.
- SARAIVA, L. K. V. *Caracterização do sistema de produção de queijo artesanal da Serra Geral-MG*. 2018. 50 f. Dissertação (Mestrado em Produção Animal) - Instituto de Ciências Agrárias, Universidade Federal de Minas Gerais, Montes Claros-MG.
- SETTANNI, L.; BUSETTA, G.; PUCCIO, V. *et al.* In-depth investigation of the safety of wooden shelves used for traditional cheese ripening. *Appl. Environ. Microbiol.*, v. 87, n. 23, p. e01524-21, 2021.
- SHAYEH, J. S.; SEFIDBAKHT, Y.; SIADAT, S. O. R. *et al.* Continuous fast Fourier transforms cyclic voltammetry as a new approach for investigation of skim milk k-casein proteolysis, a comparative study. *Int. J. Biol. Macromol.*, v. 103, p. 972-977, 2017.
- SILVA, J. N.; BALIZA, M. D.; FREITAS, F. *et al.* Genotypical characterization of thermotolerant coliforms isolated from food produced by a Solidarity Economic Venture of Bahia (Brazil). *Braz. J. Biol. Sci.*, v. 81, p. 189-194, 2020.
- SILVA, N. C.; BONSAGLIA, É. C.; JÚNIOR, A. F. *et al.* Biofilm production by *Staphylococcus* spp. on stainless steel chips in contact with Brazilian Minas cheese homogenates and BHI broth under different extrinsic factors. *J. Microbiol. Biotechnol. Food Sci.*, v. 7, n. 2, p. 190, 2017.
- SINGHAL, N.; KUMAR, M.; KANAUIA, P. K. *et al.* MALDI-TOF mass spectrometry: an emerging technology for microbial identification and diagnosis. *Front. Microbiol.*, v. 6 p. 791, 2015.
- SOBRAL, D.; COSTA, R. G. B.; PAULA, J. C. J. *et al.* Principais defeitos em queijo Minas artesanal: uma revisão. *Rev. Inst. Laticínios Cândido Tostes*, v. 72, n. 2, p. 108-120, 2017.
- SOUTHEY, R. *History of Brazil*. Londres: Longman, 1819.
- SOUZA, C. F. V.; ROSA, T. D.; AYUB, M. A. Z. Changes in microbiological and physicochemical characteristics of Serrano cheese during manufacturing and ripening. *Braz. J. Microbiol.*, v. 34, n. 3, p. 260-266, 2003.
- SOUZA, T. P.; EVANGELISTA, S. R.; PASSAMANI, F. R. F. *et al.* Mycobiota of Minas artisanal cheese: Safety and quality. *Int. Dairy J.*, v. 120, p. 105085, 2021.



- SREY, S.; JAHID, I. K.; HA, S. Biofilm formation in food industries: a food safety concern. *Food Control*, v. 31, n. 2, p. 572-585, 2013.
- SUHREN, G.; WALTE, H. G. First experiences with automatic flow cytometric determination of total bacteria count in raw milk. *Bul. Int. Dairy Fed.*, n. 358, p. 36-48, 2000.
- SUZUKI-IWASHIMA, A.; MATSUURA, H.; IWASAWA, A. *et al.* Metabolomics analyses of the combined effects of lactic acid bacteria and *Penicillium camemberti* on the generation of volatile compounds in model mold-surface-ripened cheeses. *J. Biosci. Bioeng.*, v. 129, n. 3, p. 333-347, 2020.
- SVEUM, W. H.; MOBERG, L. J.; RUDE, R. A. *et al.* *Microbiological monitoring of the food processing environment*. Em: VANDERZANT, C.; SPLITTSTOESSER, D. F.; SPECK, M. L. *Compendium of methods for the microbiological examination of foods*. 3. ed. Washington, DC: American Public Health Association, p. 51-74, 1992.
- TABLA, R.; GÓMEZ, A.; SIMANCAS, A. *et al.* Early blowing in raw goats' milk cheese: gas production capacity of Enterobacteriaceae species present during manufacturing and ripening. *J. Dairy Res.*, v. 85, n. 3, p. 331-338, 2018.
- TABOADA, N. V.; MEDINA, R. B.; NUÑEZ, M. S. *et al.* Biochemical and microbiological changes throughout the ripening of Argentinean fresh goat's milk cheeses made with native cultures. *J. Microbiol. Biotechnol. Food Sci.* v. 6, n. 5, p. 1174-1180, 2017.
- TALUKDER, A.; SAHA, A.; SHOEB, S. B. *et al.* Microbiological quality assessment of raw milk and water samples from Noakhali district, Bangladesh. *Asian J. Med. Biol. Res.*, v. 5, n. 1, p. 31-36, 2019.
- TANČIN, V.; MIKLÁŠ, Š.; MAČUHOVÁ, L. Possible physiological and environmental factors affecting milk production and udder health of dairy cows: a review. *Slovak J. Anim. Sci.*, v. 51, n. 1, p. 32-40, 2018.
- TEGEGNE, B.; TESFAYE, S. Bacteriological milk quality: possible hygienic factors and the role of *Staphylococcus aureus* in raw bovine milk in and around Gondar, Ethiopia. *Int.J. Food Contam.*, v. 4, n. 1, p. 1, 2017.
- TILOCCA, B.; COSTANZO, N.; MORITTU, V. M. *et al.* Milk microbiota: Characterization methods and role in cheese production. *J. Proteomics*, v. 210, p. 103534, 2020.
- TORKAR, K. G.; TEGER, S. G. The presence of some pathogen micro organisms, yeasts and moulds in cheese samples produced at small dairy-processing plants. *Acta Agric. Slov.*, v. 88, n. 1, p. 37-51, 2006.
- TOURNAS, V.; STACK, M. E.; MISLIVEC, P. B. *et al.* *Yeasts, molds and mycotoxins*. Em: *Bacteriological Analytical Manual Online*. 8th. Rockville, MD: United States Food and Drug Administration, 2011.
- TRMČIĆ, A.; CHAUHAN, K.; KENT, D. J. *et al.* Coliform detection in cheese is associated with specific cheese characteristics, but no association was found with pathogen detection. *J. Dairy Sci.*, v. 99, n. 8, p. 6105-6120, 2016.

- TRMČIĆ, A.; RALYEA, R.; MEUNIER-GODDIK, L. *et al.* Consensus categorization of cheese based on water activity and pH—A rational approach to systemizing cheese diversity. *J. Dairy Sci.*, v. 100, n. 1, p. 841-847, 2017.
- UNG, A.; BAIDJOE, A. Y.; VAN CAUTEREN, D. *et al.* Disentangling a complex nationwide *Salmonella* Dublin outbreak associated with raw-milk cheese consumption, France, 2015 to 2016. *Euro Surveill.*, v. 24, n. 3, 2019.
- VALÍK, L.; AČAI, P.; MEDVEĐOVÁ, A. Application of competitive models in predicting the simultaneous growth of *Staphylococcus aureus* and lactic acid bacteria in milk. *Food Control*, v. 87, p. 145-152, 2018.
- VIEITEZ, I.; IRIGARAY, B.; CALLEJAS, N. *et al.* Composition of fatty acids and triglycerides in goat cheeses and study of the triglyceride composition of goat milk and cow milk blends. *J. Food Compos. Anal.*, v. 48, p. 95-101, 2016.
- WANDERLEY, L.; BIANCHIN, A.; TEO, C. R. P. A. *et al.* Occurrence and pathogenicity of *Candida* spp. in unpasteurized cheese. *Rev. Bras. Biocienc.*, v. 11, n. 2, 2013.
- WANJALA, W. N.; NDUKO, J. M.; MWENDE, M. C. Coliforms contamination and hygienic status of milk chain in emerging economies. *J. Food Qual. Hazards Control*, v. 5, n. 1, p. 3-10, 2018.
- WASSIE, M.; WASSIE, T. Isolation and identification of lactic acid bacteria from raw cow milk. *Int. J. Adv. Res. Biol. Sci.*, v. 3, n. 8, p. 44-49, 2016.
- WEMMENHOVE, E.; VAN VALENBERG, H. J.; ZWIETERING, M. H. *et al.* Minimal inhibitory concentrations of undissociated lactic, acetic, citric and propionic acid for *Listeria monocytogenes* under conditions relevant to cheese. *Food Microbiol.*, v. 58, p. 63-67, 2016.
- WILKINSON, J.; CERDAN, C.; DORIGON, C. Geographical Indications and “Origin” Products in Brazil—The Interplay of Institutions and Networks. *World Dev.*, v. 98, p. 82-92, 2017.
- WU, Q.; SHAH, N. P. The potential of species-specific tagatose-6-phosphate (T6P) pathway in *Lactobacillus casei* group for galactose reduction in fermented dairy foods. *Food Microbiol.*, v. 62, p. 178-187, 2017.
- WUSIMANJIANG, P.; OZTURK, M.; AYHAN, Z. *et al.* Effect of salt concentration on acid-and salt-adapted *Escherichia coli* O157: H7 and *Listeria monocytogenes* in recombined nonfat cast cheese. *J. Food Process. Preserv.*, v. 43, n. 11, p. e14208, 2019.
- YOON, Y.; LEE, S.; CHOI, K. H. Microbial benefits and risks of raw milk cheese. *Food Control*, v. 63, p. 201-215, 2016.
- YUSOF, A. A.; BAKRI, S.; MISHA, S. TDS and pH Analysis for Water Quality Monitoring in Water Hydraulics Food Processor. *Int. J. Integr. Eng.*, v. 11, n. 4, 2019.
- ZARAVELA, A.; KONTAKOS, S.; BADEKA, A. V. *et al.* Effect of adjunct starter culture on the quality of reduced fat, white, brined goat cheese: part I. Assessment of chemical composition, proteolysis, lipolysis, texture and sensory attributes. *Eur. Food Res. Technol.*, p. 1-15, 2021.

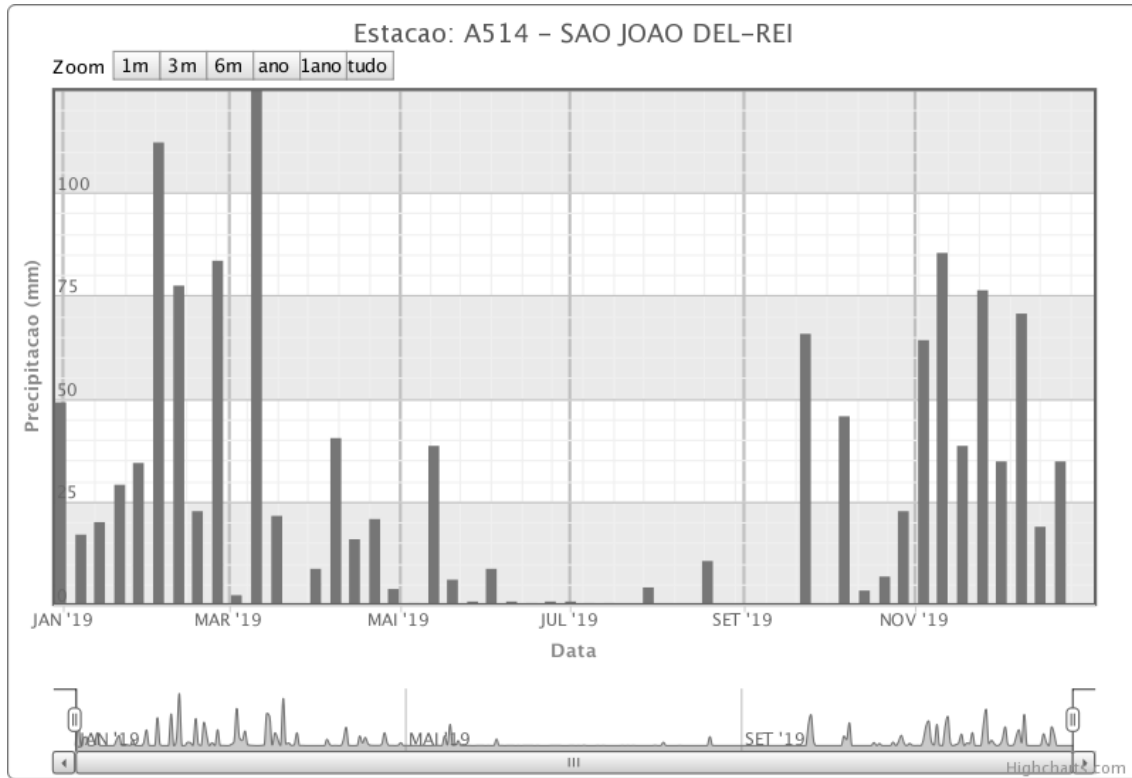
ZELNY, R.; NIA, Y.; SCHIMMEL, H. *et al.* Certified reference materials for testing of the presence/absence of *Staphylococcus aureus* enterotoxin A (SEA) in cheese. *Anal. Bioanal. Chem.*, v. 408, n. 20, p. 5457-5465, 2016.

ZHENG, X.; LI, K.; SHI, X. *et al.* Potential characterization of yeasts isolated from Kazak artisanal cheese to produce flavoring compounds. *Microbiologyopen*, v. 7, n. 1, p. e00533, 2018.

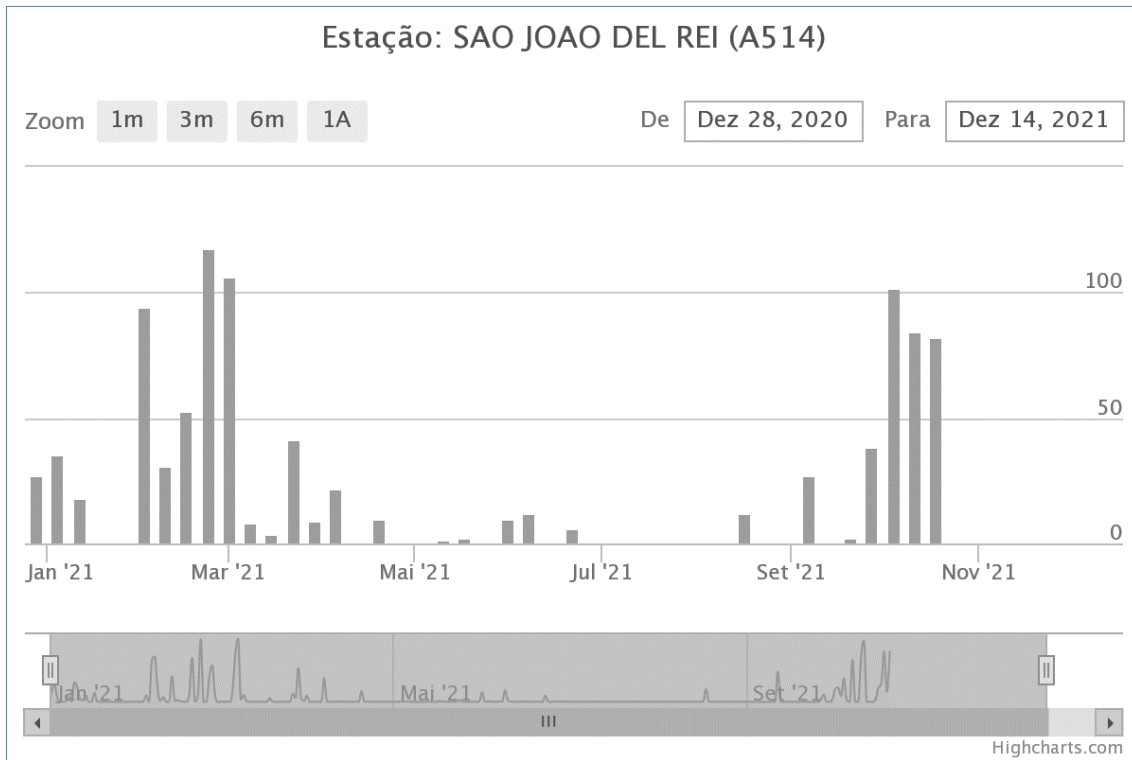
ZWIERZCHOWSKI, G.; AMETAJ, B. N. Mineral elements in the raw milk of several dairy farms in the Province of Alberta. *Foods*, v. 8, n. 8, p. 345, 2019.

## 9. ANEXOS

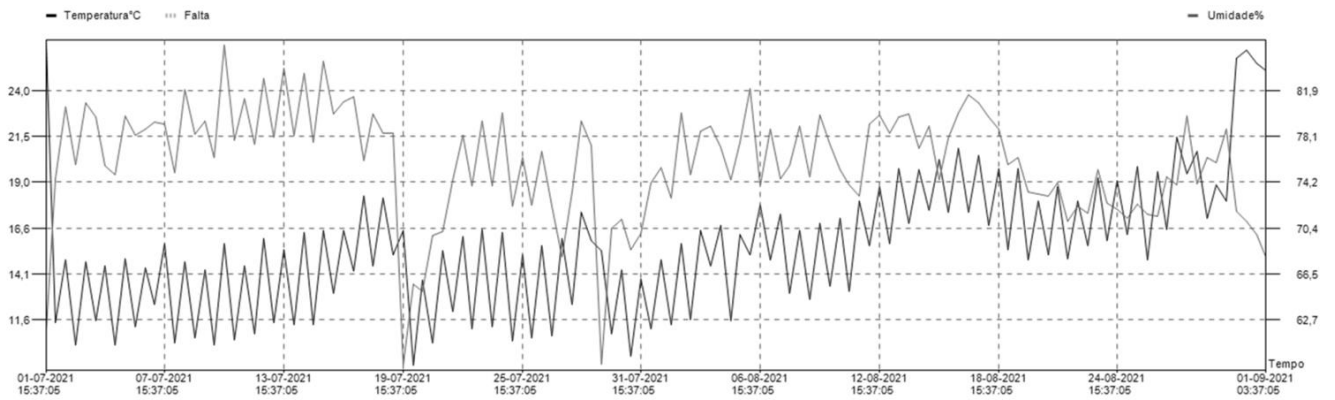
**ANEXO I:** Distribuição bimensual da precipitação (mm) na região da estação climática de São João del-Rei em 2019.



**ANEXO II:** Distribuição bimensal da precipitação (mm) na região da estação climática de São João del-Rei em 2021.



**ANEXO III: Valores de umidade (%) e temperatura (°C) de ambientes de maturação de queijos Minas artesanais da mesorregião de Campo das Vertentes durante o período seco em 2021.**



ANEXO IV: Cartaz de divulgação do dia de campo “Uma tarde com o QMA”.

**DIA DE CAMPO**

**"Uma tarde com o QMA"**

**Programação**

**11 de fevereiro**

**13h30min: Prática sobre higiene e protocolos de ordenha e produção de queijos artesanais –Emater-MG**

**15h30min – 16h: lanche**

**16h: Palestra Qualidade de Queijo Minas Artesanal**  
**Dra Liliane Denize Miranda Menezes**  
**Supervisora do Laboratório de Segurança Microbiológica de Alimentos (LSMA) – IMA**

**17h: sessão de perguntas**

**17h30min: encerramento**

**Faça sua INSCRIÇÃO até 21 de JANEIRO NO LINK:**  
[https://docs.google.com/forms/d/1YaA\\_x0ISX8oY6-7LhNUAWB8NJrII\\_gmaVlrP0ku9f8I/edit#responses](https://docs.google.com/forms/d/1YaA_x0ISX8oY6-7LhNUAWB8NJrII_gmaVlrP0ku9f8I/edit#responses)

**11 de FEVEREIRO de 2022**  
**Local: R. Imigrante Lucindo Taroco, s/n**  
**Colônia do Felizardo**  
**São João del Rei - MG, 36302-488**

**EPAMIG**

**IMA**  
 Instituto Mineiro de Agropecuária

**UFMG**  
 Universidade Federal de Minas Gerais

**FAPEMIG**

**UFSJ**  
 Universidade Federal de São João del-Rei

**EMATER**  
 Minas Gerais

**AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO**

**MINAS GERAIS**  
 GOVERNO DIFERENTE. ESTADO EFICIENTE.