

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
ESCOLA DE VETERINÁRIA
COLEGIADO DO CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO**

**QUEIJO MINAS ARTESANAL FRESCO DE PRODUTORES NÃO
CADASTRADOS DA MESORREGIÃO DE CAMPO DAS VERTENTES – MG:
QUALIDADE MICROBIOLÓGICA E FÍSICO-QUÍMICA EM DIFERENTES
ÉPOCAS DO ANO**

RENATA DIAS DE CASTRO

**BELO HORIZONTE - MG
ESCOLA DE VETERINÁRIA DA UFMG
2015**

Renata Dias de Castro

**QUEIJO MINAS ARTESANAL FRESCO DE PRODUTORES NÃO
CADASTRADOS DA MESORREGIÃO DE CAMPO DAS VERTENTES – MG:
QUALIDADE MICROBIOLÓGICA E FÍSICO-QUÍMICA EM DIFERENTES
ÉPOCAS DO ANO**

Dissertação apresentada à
Escola de Veterinária da
Universidade Federal de
Minas Gerais - UFMG, como
requisito para obtenção do
grau de Mestre em
Ciência Animal.

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

Orientador: Marcelo Resende
de Souza

Co-orientadora: Andreia
Marçal da Silva

**BELO HORIZONTE - MG
ESCOLA DE VETERINÁRIA DA UFMG
2015**

C355q Castro, Renata Dias de, 1989-
Queijo Minas artesanal fresco de produtores não cadastrados da mesorregião de Campo das Vertentes – MG: qualidade microbiológica e físico-química em diferentes épocas do ano / Renata Dias de Castro. – 2015.
125 p. : il.

Orientador: Marcelo Resende de Souza

Co-orientadora: Andreia Marçal da Silva

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Veterinária.
Inclui bibliografia

1. Queijo-de-minas – Análise – Teses. 2. Queijo-de-minas – Qualidade – Teses.
3. Queijo-de-minas – Microbiologia – Teses. I. Souza, Marcelo Resende de. II. Silva, Andreia Marçal da. III. Universidade Federal de Minas Gerais. Escola de Veterinária.
IV. Título.

CDD – 637

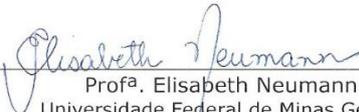
FOLHA DE APROVAÇÃO

RENATA DIAS DE CASTRO

Dissertação submetida à banca examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em CIÊNCIA ANIMAL, como requisito para obtenção do grau e MESTRE em CIÊNCIA ANIMAL, área de concentração TECNOLOGIA E INPEÇÃO DE PRODUTOS DE ORIGEM ANIMAL.

Aprovada em 10 de fevereiro de 2015, pela banca constituída pelos membros:


Prof. Marcelo Resende de Souza
Presidente - Orientador


Profª. Elisabeth Neumann
Universidade Federal de Minas Gerais


Profª. Cláudia Freire de Andrade Morais Penna
Universidade Federal de Minas Gerais


Drª. Liliãne Denize Miranda Menezes
Instituto Mineiro de Agropecuária

Agradecimentos

Agradeço primeiramente a Deus pela benção da vida. Por ter sido a luz, a serenidade e a força que me guiaram ao longo desta trajetória.

Aos meus pais, Adevaldo e Delma, agradeço pelos ensinamentos e valores que foram os pilares para a formação de quem hoje sou. Obrigada pelo esforço contínuo para que tudo pudesse dar certo, pelo incentivo, amor e palavras amigas. Ao meu pai, por ser o grande exemplo de profissional que é para mim. À minha mãe por ser o maior coração que já conheci.

Aos meus queridos irmãos, Vanessa e Ricardo, agradeço por sempre estarem ao meu lado me apoiando em todas as minhas escolhas. Nada seria sem a amizade, sem os risos, sem a cumplicidade e o amor de vocês.

Ao Thiago, meu noivo, agradeço pelo carinho, pelo cuidado e pela ajuda na realização deste trabalho. Obrigada por me fortalecer, por me incentivar, por me inspirar e me fazer tão bem.

À minha família, em especial a tia Ceci, por ser a melhor parte de mim.

À Escola de Veterinária da UFMG, por permitir a realização deste sonho.

Ao meu orientador Marcelo Resende, agradeço por todos os ensinamentos desde a graduação e por despertar em mim o amor pela área de tecnologia e inspeção de leite e produtos derivados. Você é o maior exemplo profissional e pessoal que tenho dentro do universo acadêmico. Obrigada por ser tão presente, pela amizade e por todas as orientações valiosas durante este período.

À minha co-orientadora Andréia Marçal, agradeço pelo incentivo e por todas as orientações dadas. Obrigada pela confiança e participação ativa ao longo deste experimento. As viagens a Campo das Vertentes não seriam as mesmas sem a sua disposição e alegria.

Aos produtores de queijo Minas artesanal de Campo das Vertentes, por gentilmente terem nos recebido em suas propriedades e pela contribuição na execução deste projeto. Obrigada pelos exemplos de vida, de simplicidade e de força que me passaram. Foi muito gratificante trabalhar e aprender com vocês.

À banca examinadora, pelas sugestões e críticas.

À EMATER, em especial ao Franklin Cordeiro, Clécio Spuri e Bolívar dos Santos pela parceria e pelo apoio incondicional a realização do nosso trabalho na região de Campo das Vertentes.

Aos professores do DTIPOA, em especial à professora Cláudia Penna, pela participação na minha formação e disponibilidade sempre que preciso.

Aos meus amigos de laboratório, Cosme, Giva, Gabi, Letícia, Livia, Carol, Felipe, Gilson, Naiara, Cíntia, Carlos e Marcela por tornarem este trabalho possível e pela convivência fantástica. Obrigada por serem a melhor equipe de trabalho do qual já fiz parte! Sem dúvida, tê-los ao meu lado foi essencial para o andamento e finalização deste experimento.

Ao Leonardo Acurcio (Leo) e Dalila Lapinha pelo incentivo desde quando ainda era aluna de iniciação científica. Obrigada pelos ótimos conselhos, ensinamentos e pela amizade.

Ao Sávio Sandes, Luige Alvim e aos demais colegas do LGMPP por me receberem tão bem, pelos ensinamentos na área da biologia molecular e por toda a ajuda.

Aos técnicos e amigos de laboratório do DTIPOA Maura Regina de Almeida Moura (Maurinha), Marco Antônio Guerra e César Victor Brandão Araújo pelo conhecimento, pela paciência e por toda colaboração dada.

Ao Milton Luiz de Jesus (Miltinho), pela disposição em me ajudar sempre que preciso.

Ao Laboratório de Genética do Departamento de Zootecnia (EV-UFMG) pela realização das análises de sequenciamento.

Ao LabUFMG, pela realização das análises laboratoriais parciais do leite.

Aos meus amigos Guilherme Picinin, Baltazar Ruas, Karina Roque, Samuel Dias, Guilherme Resende, Isabela Lanza, Luiz Eduardo, Lívia Maria, Renata Stefani, Amanda Mendes, Cynthia Santos, Luiza Coutinho, Lud Barbi, Michelle Santos, Marcela Cavalcante, Bruna Melo, Flávia Morais, Fernanda Mota e tantos outros por torcerem por mim e serem tão especiais!

Ao Apolo, Luka, Maya, Radar, Noturno e a todos os outros companheirinhos que tive o prazer de conviver, por serem as alegrias na minha vida!

À FAPEMIG pelo apoio financeiro do projeto e à CAPES pela concessão da bolsa.

SUMÁRIO

	RESUMO	
	ABSTRACT	
1.	INTRODUÇÃO	15
2.	OBJETIVOS	16
2.1.	Objetivo geral	16
2.2.	Objetivos específicos	16
3.	REVISÃO DE LITERATURA	17
3.1.	Queijos	17
3.2.	Queijos artesanais no Brasil	18
3.2.1.	Queijo Minas artesanal	19
3.2.1.1.	Histórico	19
3.2.1.2.	Aspectos legais de produção e comercialização	20
3.2.1.3.	Caracterização e forma de produção	22
3.2.1.4.	Campo das Vertentes como região produtora	24
3.2.1.5.	Influência da maturação e período do ano	26
3.2.1.6.	Boas Práticas de Fabricação e Boas Práticas Agropecuárias	28
3.3.	Qualidade microbiológica e físico-química da água	29
3.4.	Qualidade microbiológica de soro-fermento	31
3.5.	Qualidade microbiológica de leite cru	32
3.5.1.	Contagem de Células Somáticas e Contagem Bacteriana Total	33
3.5.2.	Coliformes totais e termotolerantes	34
3.5.3.	<i>Staphylococcus</i> spp.	35
3.5.4.	<i>Salmonella</i> spp.	36
3.5.5.	Bactérias ácido-láticas	36
3.5.6.	Bolores e leveduras	37
3.6.	Qualidade físico-química de leite cru	38
3.7.	Qualidade microbiológica de queijos artesanais	39
3.7.1.	Coliformes totais e termotolerantes	40
3.7.2.	<i>Staphylococcus</i> spp.	42
3.7.3.	<i>Salmonella</i> spp.	43
3.7.4.	Bactérias ácido-láticas	44
3.7.5.	Bolores e leveduras	47
3.8.	Qualidade físico-química de queijos artesanais	49
3.8.1.	Extrato seco total	49
3.8.2.	Umidade	49
3.8.3.	Gordura	50
3.8.4.	pH	51
3.8.5.	Acidez titulável	52
3.8.6.	Proteína total	53
4.	MATERIAL E MÉTODOS	54
4.1.	Amostragem e aquisição de queijo Minas artesanal fresco, água, leite cru e soro-fermento	54
4.2.	Perfil das propriedades amostradas e queijarias produtoras de queijo Minas artesanal fresco	54
4.3.	Análises laboratoriais	55
4.3.1.	Qualidade microbiológica e físico-química de água	55

4.3.2.	Qualidade microbiológica de soro-fermento	55
4.3.3.	Qualidade microbiológica e físico-química de leite cru	55
4.3.4.	Qualidade microbiológica de queijo Minas artesanal fresco	56
4.3.5.	Pesquisa de <i>Staphylococcus</i> coagulase positivo nos manipuladores de queijo Minas artesanal fresco	56
4.4.	Metodologias utilizadas nas avaliações de parâmetros microbiológicos de qualidade	56
4.4.1.	Pesquisa de <i>Staphylococcus</i> coagulase positivo nos manipuladores de queijo Minas artesanal fresco	56
4.4.2.	Pesquisa de coliformes a 30°C e a 45°C	57
4.4.3.	Pesquisa de <i>Staphylococcus</i> spp. e <i>Staphylococcus</i> coagulase positivo	57
4.4.4.	Pesquisa de <i>Salmonella</i> spp.	58
4.4.5.	Pesquisa de bolores e leveduras	58
4.4.6.	Contagem padrão em placas de micro-organismos mesófilos aeróbios	58
4.4.7.	Isolamento, enumeração e identificação molecular de bactérias ácido-láticas de água, leite cru, soro-fermento e queijo Minas artesanal fresco	59
4.4.7.1.	Enumeração de bactérias ácido-láticas	59
4.4.7.2.	Isolamento e seleção das colônias para identificação molecular	59
4.4.7.3.	Pré-tratamento das colônias e extração do DNA	59
4.4.7.4.	Amplificação e sequenciamento da região 16S do rDNA	60
4.4.7.5.	Diferenciação das espécies <i>Lactobacillus plantarum</i> , <i>Lactobacillus paraplantarum</i> e <i>Lactobacillus pentosus</i> por meio de técnica de PCR multiplex	60
4.4.7.6.	Diferenciação das espécies <i>Lactobacillus casei</i> , <i>Lactobacillus paracasei</i> e <i>Lactobacillus rhamnosus</i> por PCR espécie-específico	61
4.5.	Qualidade físico-química de queijo Minas artesanal fresco	61
4.6.	Delineamento experimental e análise estatística	61
5.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	63
5.1.	Perfil das propriedades amostradas e queijarias produtoras de queijo Minas artesanal fresco	63
5.2.	Pesquisa de <i>Staphylococcus</i> coagulase positivo nos manipuladores de queijo Minas artesanal fresco	64
5.3.	Qualidade microbiológica e físico-química de água	67
5.4.	Qualidade microbiológica de soro-fermento	73
5.5.	Qualidade microbiológica e físico-química de leite cru	76
5.6.	Qualidade microbiológica de queijo Minas artesanal fresco	81
5.7.	Qualidade físico-química de queijo Minas artesanal fresco	85
5.8.	Identificação molecular de bactérias ácido-láticas de água, leite cru, soro-fermento e queijo Minas artesanal fresco	88
6.	CONCLUSÕES	96
7.	CONSIDERAÇÕES FINAIS	97
8.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	98
9.	ANEXOS	123

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Microrregiões da mesorregião de Campo das Vertentes, seus municípios e municípios autorizados pelo programa queijo Minas artesanal	25
Tabela 2.	Parâmetros microbiológicos estabelecidos para inspeção de água utilizada na produção de queijo Minas artesanal	29
Tabela 3 -	Parâmetros físico-químicos estabelecidos para inspeção de água utilizada na produção de queijo Minas artesanal	30
Tabela 4 -	Parâmetros microbiológicos estabelecidos para inspeção de leite cru destinado à produção de queijo Minas artesanal	33
Tabela 5 -	Parâmetros físico-químicos estabelecidos para inspeção de leite cru destinado à produção de queijo Minas artesanal	38
Tabela 6 -	Parâmetros microbiológicos estabelecidos para inspeção de queijo Minas artesanal, segundo legislação estadual e federal vigentes	40
Tabela 7 -	Resultados da pesquisa de <i>Staphylococcus</i> coagulase positivo nas amostras biológicas dos manipuladores de queijo Minas artesanal fresco, segundo o tipo de colônia isolada e resultado no teste de coagulase realizado nas colônias típicas e atípicas crescidas no ágar Baird Parker, e nas colônias amarelas crescidas no ágar Sal Manitol	65
Tabela 8 -	Médias, coeficientes de variação (CV), medianas, valores mínimo e máximo dos resultados de parâmetros microbiológicos de qualidade de água de queijarias de produtores não cadastrados na região de Campo das Vertentes – MG	67
Tabela 9 -	Médias, coeficientes de variação (CV), medianas, valores mínimo e máximo dos resultados de parâmetros físico- químicos de qualidade de água de queijarias de produtores não cadastrados na região de Campo das Vertentes – MG	72
Tabela 10 -	Médias, coeficientes de variação (CV), medianas, valores mínimo e máximo dos resultados de parâmetros microbiológicos de qualidade de soro-fermento de queijarias de produtores não cadastrados na região de Campo das Vertentes – MG	74
Tabela 11 -	Médias, coeficientes de variação (CV), medianas, valores mínimo e máximo dos resultados de Contagem de Células Somáticas (CCS) e Contagem Bacteriana Total (CBT) de leite cru obtido em queijarias de produtores não cadastrados na região de Campo das Vertentes – MG	76

Tabela 12 -	Médias, coeficientes de variação (CV), medianas, valores mínimo e máximo dos resultados de parâmetros microbiológicos de qualidade de leite cru de queijarias de produtores não cadastrados na região de Campo das Vertentes – MG	77
Tabela 13 -	Médias, coeficientes de variação (CV), medianas, valores mínimo e máximo dos resultados de parâmetros físico-químicos de qualidade de leite cru de queijarias de produtores não cadastrados na região de Campo das Vertentes – MG	79
Tabela 14 -	Médias, coeficientes de variação (CV), medianas, valores mínimo e máximo dos resultados de parâmetros microbiológicos de qualidade de queijo Minas artesanal fresco de queijarias de produtores não cadastrados na região de Campo das Vertentes – MG	81
Tabela 15 -	Médias, coeficientes de variação (CV), medianas, valores mínimo e máximo dos resultados de parâmetros físico-químicos de qualidade de queijo Minas artesanal fresco de queijarias de produtores não cadastrados na região de Campo das Vertentes – MG	86
Tabela 16 -	Identificação molecular de bactérias ácido-láticas isoladas a partir de amostras de água, leite cru, soro-fermento e queijo Minas artesanal fresco coletadas de queijarias de produtores não cadastrados na região de Campo das Vertentes – MG, de acordo com o período do ano	89

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Mapa dos queijos artesanais de Minas Gerais	22
Figura 2 -	Fluxograma de produção do queijo Minas artesanal	24
Figura 3 -	Mapa com as mesorregiões de Minas Gerais	25
Figura 4 -	Temperatura diária mínima para o mês de dezembro de 2013 da estação de Barbacena, Campo das Vertentes – MG	69
Figura 5 -	Temperatura diária mínima para o mês de abril de 2014 da estação de Barbacena, Campo das Vertentes – MG	70
Figura 6 -	Chuva acumulada mensal e número de dias com chuva para o ano de 2013 da estação de Barbacena, Campo das Vertentes - MG	70
Figura 7 -	Temperatura diária mínima para o mês de julho de 2014 da estação de Barbacena, Campo das Vertentes - MG	71
Figura 8 -	Chuva acumulada mensal e número de dias com chuva para o ano de 2014 da estação de Barbacena, Campo das Vertentes – MG	71
Figura 9 -	Produtos da amplificação do 16S rDNA por PCR de algumas das amostras de bactérias ácido-láticas	124

Figura 10 -	Produtos da amplificação da região do gene <i>recA</i> a partir da técnica de PCR <i>multiplex</i> das amostras identificadas como <i>Lactobacillus plantarum</i>	125
Figura 11 -	Produtos da amplificação da região V1 a partir da técnica de PCR das amostras identificadas como <i>Lactobacillus paracasei</i> e <i>Lactobacillus rhamnosus</i>	125

LISTA DE ANEXOS

Anexo 1 -	Questionário para elaboração do perfil higiênico-sanitário das propriedades e queijarias dos produtores não cadastrados pelo IMA em Campo das Vertentes – MG.	123
Anexo 2 -	Produtos da amplificação do 16S rDNA por PCR de algumas das amostras de bactérias ácido-láticas	124
Anexo 3 -	Produtos da amplificação da região do gene <i>recA</i> a partir da técnica de PCR <i>multiplex</i> das amostras identificadas como <i>Lactobacillus plantarum</i>	125
Anexo 4 -	Produtos da amplificação da região V1 a partir da técnica de PCR das amostras identificadas como <i>Lactobacillus paracasei</i> e <i>Lactobacillus rhamnosus</i> .	125

LISTA DE ABREVIATURAS

μL	Microlitros
ABIQ	Associação Brasileira das Indústrias de Queijos
A.C.	Antes de Cristo
BAL	Bactérias Ácido-Láticas
BPA	Boas Práticas Agropecuárias
BPF	Boas Práticas de Fabricação
BPLS	Ágar verde brilhante vermelho de fenol lactose sacarose
Ca^{+2}	Íons de cálcio
CaCO_3	Carbonato de Cálcio
Cl_2	Cloro
CBT	Contagem Bacteriana Total
CCS	Contagem de Células Somáticas
CO_2	Dióxido de Carbono
CV	Coefficiente de Variação
DTIPOA	Departamento de Tecnologia e Inspeção de Produtos de Origem Animal
EDTA	Ácido Etileno Diamino Tetracético
EMATER	Empresa de Assistência Técnica e Extensão Rural
EST	Extrato Seco Total
EV	Escola de Veterinária
g	Gramas
GES	Gordura no extrato seco total
H_2O_2	Peróxido de hidrogênio
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
IMA	Instituto Mineiro de Agropecuária
KB	Kilobase
L	Litro
M	Molar
MAPA	Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
MG	Minas Gerais
mg	Miligramas
Mg^{+2}	Íon magnésio
mL	Mililitro
mM	Milimolar
MRS	Man-Rogosa-Sharpe
NMP	Número Mais Provável
PCA	Plate Count Agar
PCR	Polymerase Chain Reaction
ppm	Partes Por Milhão
rDNA	DNA ribossomal
RIISPOA	Regulamento da Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal
SISBI - POA	Sistema Brasileiro de Inspeção de Produtos de Origem Animal
SUASA	Sistema Único de Atenção à Sanidade Agropecuária
t	Tonelada
UFMG	Universidade Federal de Minas Gerais
UFC	Unidade Formadora de Colônia
x g	Gravidade
μmols	Picomols

RESUMO

A produção de queijo Minas artesanal (QMA) é uma atividade tradicional em vários municípios de Minas Gerais. Preconiza-se a utilização de leite-cru e soro-fermento, popularmente conhecido como pingo, nas regiões produtoras. O queijo Minas artesanal apresenta uma microbiota diversificada influenciada pelas características históricas, agroecológicas e climáticas de cada região do estado onde é produzido. Após a identificação legal de Campo das Vertentes como produtora de queijo Minas artesanal, tem-se visto, na região, um número cada vez maior de produtores interessados em obter o cadastramento no Serviço de Inspeção Estadual. Nesse sentido, caracterizar o queijo Minas artesanal elaborado por produtores não cadastrados na região de Campo das Vertentes se faz necessário tanto para o conhecimento do queijo produzido quanto para a legalização destes produtores. O objetivo do trabalho foi comparar, dos pontos de vista microbiológico e físico-químico, queijos Minas artesanais frescos elaborados por produtores não cadastrados no Instituto Mineiro de Agropecuária nos períodos da seca e da chuva. Foram coletadas amostras de água, leite cru, soro-fermento e queijo com um dia de produção de propriedades rurais localizadas na região de Campo das Vertentes. Em relação as amostras de água, houve maior contagem de mesófilos aeróbios, menor pH e menor concentração de cloro residual no período da chuva ($p < 0,05$). As médias de CCS e medianas de CBT das amostras de leite foram semelhantes ($p > 0,05$), independentemente da época do ano. A gordura do leite cru foi superior ($p < 0,05$) no período da chuva. As medianas de NMP de coliformes a 30°C e coliformes a 45°C das amostras de queijo e leite cru e, no caso do soro-fermento, apenas as medianas de NMP de coliformes a 30°C, foram superiores ($p < 0,05$) no período da chuva. O queijo elaborado no período da seca apresentou maior contagem de bactérias ácido-láticas, no meio ágar M17, de bolores e leveduras e maior acidez titulável ($p < 0,05$). Os queijos apresentaram altos teores de umidade sendo classificados como queijos de alta umidade e muito alta umidade, na chuva e seca, respectivamente. *Staphylococcus* spp. foi encontrado em contagens elevadas, sendo que queijo e soro-fermento coletados no período da chuva apresentaram maior contagem de *Staphylococcus* coagulase positivo ($p < 0,05$). Do total de manipuladores de queijo Minas artesanal, 42,86% foram portadores de *Staphylococcus* coagulase positivo em suas mãos. *Salmonella* spp. não foi isolada nas amostras de leite cru, soro-fermento e queijo Minas artesanal fresco. Bactérias ácido-láticas foram encontradas em elevadas contagens nas amostras de leite cru, soro-fermento e queijo. Dentre as amostras identificadas por biologia molecular, *Enterococcus faecalis* apresentou frequência de isolamento (44%) mais elevada nas amostras de leite, soro-fermento e queijo, seguida por *Lactococcus lactis* (20%) e *Lactobacillus plantarum* (16%). *Enterococcus durans*, *Enterococcus pseudoavium*, *Aerococcus viridans* e *Lactobacillus brevis* foram isolados de soro-fermento utilizado na elaboração de queijo Minas artesanal fresco, sem haver descrições prévias na literatura pesquisada da presença desses micro-organismos neste tipo de produto. Os resultados deste trabalho indicaram, de forma geral, maior contaminação do queijo e de suas matérias-primas no período da chuva. A estação do ano também influenciou, em menor intensidade, nos parâmetros físico-químicos de água, leite cru e queijo. Adicionalmente, este estudo reforçou a necessidade de adequações na cadeia de produção do QMA, nas propriedades não cadastradas da região de Campo das Vertentes, para a garantia de um produto seguro, competitivo e valorizado por suas características tradicionais.

Palavras chave: Queijo Minas artesanal fresco, microbiologia, físico-química, qualidade, inspeção

ABSTRACT

The production of artisanal Minas cheese is traditional in Minas Gerais. This cheese is made using raw cow' milk and endogenous culture. The artisanal Minas cheese presents a diverse microbiota influenced by region of the state where it is produced. There are few data about the microbiota present in this food. The aim of this study was to determine the microbiological and physical-chemical characteristics of artisanal Minas cheese produced by non-registered cheesemakers from Campos das Vertentes region, Minas Gerais, in two different seasons, rainy and dry seasons. Samples of water, raw milk, endogenous culture and cheese from rural properties were analyzed. In water, Aerobic Plate Count (APC) was higher ($p < 0.05$) in the rainy season. However, the pH and residual chlorine was higher ($p < 0.05$) in the dry season ($p < 0.05$). There were not any differences on the Somatic Cell Counts (SCC) and Total Bacterial Count (TBC) in samples of milk when seasons were compared. The fat of the raw milk was higher ($p < 0.05$) in the rainy season. The most probable number of total and thermotolerant coliforms was significant difference ($p < 0.05$) in samples of raw milk and cheese. In endogenous culture, the most probable number of thermotolerant coliforms was higher ($p < 0.05$) in the dry rainy season. The cheese exhibited higher counts of lactic acid bacteria, in M17 medium, molds and yeasts and higher acidity in the dry season ($p < 0.05$). The cheeses exhibited high moisture regardless of the season. *Staphylococcus* spp. was found in high numbers in cheeses and *Staphylococcus* coagulase positive were higher ($p < 0.05$) in cheese and endogenous culture during the rainy season. Fifty percent of artisanal Minas cheese handlers were carriers of *Staphylococcus* coagulase positive in their hands. *Salmonella* spp. were not detected in any sample inspected. High counts of lactic acid bacteria (LAB) were observed in all samples. *Enterococcus faecalis* was the most frequent (44%) species in milk, endogenous culture and cheese, followed by *Lactococcus lactis* (20%) and *Lactobacillus plantarum* (16%). *Enterococcus durans*, *Enterococcus pseudoavium*, *Aerococcus viridans* and *Lactobacillus brevis* were isolated from endogenous culture and it is probably the first description of these LAB in this product. These results indicated more contamination of samples in the rainy season. The seasons also influenced the physical and chemical parameters of water, raw milk and cheese. These results suggest the need of adjustments in the production of artisanal Minas cheese in order to guarantee a safe and competitive food, aside from being valorized for its traditional characteristics.

Keywords: Minas artisanal cheese, microbiology, physical-chemical, quality, inspection

1. INTRODUÇÃO

O queijo Minas artesanal (QMA) apresenta elevada produção e comercialização em Minas Gerais. A elaboração centenária deste queijo é uma atividade tradicional de vários municípios e, além de ser a principal fonte de renda de grande parte dos pequenos produtores, está ligada à identidade sócio-cultural da população mineira (Furtado, 1980). Estes queijos são produzidos em pequena escala, basicamente com a mesma tecnologia. Porém, os fatores edafoclimáticos, socioculturais, aqueles relacionados ao rebanho e a microbiota diversificada de suas matérias-primas, representativa da região do estado onde é produzido, conferem a cada queijo características sensoriais diferenciadas e peculiares.

Patrimônio imaterial brasileiro (IPHAN, 2008), o modo de fazer o queijo Minas artesanal preconiza a utilização de leite cru e de técnicas tradicionais durante a sua elaboração, como a prensagem manual. Por este motivo, o QMA pode veicular bactérias potencialmente patogênicas e/ou toxinas, representando importante questão de saúde pública. Por outro lado, a presença de micro-organismos desejáveis neste queijo, representados principalmente pelas bactérias ácido-láticas, aliada a adoção de medidas higiênico-sanitárias ao longo de toda a sua cadeia de produção podem auxiliar na segurança alimentar do QMA. Dada a importância de se garantir a segurança de consumo desse produto, de forma a contribuir para a sua valorização e preservação, faz-se necessário um estudo minucioso do queijo Minas artesanal de Campo das Vertentes, foco deste trabalho.

Campo das Vertentes é uma das doze mesorregiões do estado de Minas Gerais e há indícios de que possa ter sido o primeiro local no país onde houve a produção de queijo. A região é responsável pela produção de 313,512 mil litros de leite, cerca de 4 % do montante total do estado, e tem o melhor aproveitamento estadual em relação a produtividade por animal, o correspondente a 2.049 litros por vaca por ano (IBGE, 2010b). Além de uma expressiva aptidão leiteira, a região de Campo das Vertentes é também um importante polo turístico, o que contribui para a manutenção local da tradição de elaboração do queijo Minas artesanal.

Em 2009, a mesorregião de Campos das Vertentes recebeu a identificação legal de região produtora de queijo Minas artesanal (Minas Gerais, 2009) e possui, até o presente momento, somente quatro produtores cadastrados no Instituto Mineiro de Agropecuária (IMA). O desenvolvimento e o fortalecimento das políticas públicas de apoio ao produtor de QMA na região têm atraído um número cada vez maior de produtores interessados em obter o cadastro no Serviço de Inspeção Estadual e, assim, comercializar o seu produto no âmbito estadual e nacional.

Embora esforços tenham sido feitos por órgãos públicos e agências de extensão rural no intuito de melhorias na elaboração deste queijo, pouca informação se tem, em termo de pesquisa científica, a respeito do processo de produção, da microbiota autóctone e das condições microbiológicas e físico-químicas dos queijos produzidos no estado, em especial, por produtores não cadastrados nos Serviços de Inspeção. Além disso, pouco se sabe sobre a qualidade microbiológica e físico-química da água, leite cru e soro-fermento utilizados nas queijarias para a elaboração deste queijo, e que influenciam diretamente na qualidade final do QMA.

Sabendo-se que cada queijo Minas artesanal apresenta características peculiares conforme a tradição histórica e cultural da região do estado onde é produzido, torna-se necessária a caracterização microbiológica e físico-química do queijo Minas artesanal em Campo das

Vertentes, tanto para o direcionamento das adequações nos núcleos produtores, visando a obtenção de um alimento seguro ao consumidor, quanto para a inspeção higiênico-sanitária do queijo produzido. Adicionalmente, caracterizar a microbiota láctica presente na água, no leite cru, no soro fermento e nos queijos elaborados nesta região contribui para o conhecimento a respeito dos micro-organismos desejáveis ao processo de elaboração do QMA, ao mesmo tempo em que auxilia na consolidação e preservação de sua identidade. Desta forma, o estudo do queijo Minas artesanal da mesorregião se faz necessário uma vez que, embora haja legislação que o reconheça, as informações sobre sua microbiota endógena e propriedades físico-químicas ainda são escassas.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral:

Avaliar a influência do período do ano, seca e chuva, sobre as características microbiológicas e físico-químicas de queijo Minas artesanal fresco elaborado em propriedades não cadastradas pelo Instituto Mineiro de Agropecuária da região de Campo das Vertentes, Minas Gerais.

2.2. Objetivos Específicos:

- Comparar o perfil microbiológico (contagem de bactérias ácido-láticas, Número Mais Provável de coliformes a 30°C e a 45°C, contagem de *Staphylococcus* spp. e *Staphylococcus* coagulase positivo, contagem de bolores e leveduras e pesquisa de *Salmonella* spp.) de queijos Minas artesanais frescos produzidos nos períodos da chuva e da seca, na mesorregião de Campo das Vertentes, em propriedades não cadastradas pelo Instituto Mineiro de Agropecuária.
- Comparar o perfil microbiológico (contagem de bactérias ácido-láticas, Número Mais Provável de coliformes a 30°C e a 45°C, contagem de *Staphylococcus* spp. e *Staphylococcus* coagulase positivo, contagem de bolores e leveduras e pesquisa de *Salmonella* spp.) do fermento endógeno e leite, matérias-primas para elaboração do queijo Minas artesanal fresco de Campo das Vertentes, nos períodos da chuva e da seca.
- Comparar a contagem bacteriana total, a contagem de células somáticas e a composição centesimal do leite cru usado na elaboração de queijo Minas artesanal fresco de Campo das Vertentes, nos períodos da chuva e da seca.
- Comparar o perfil microbiológico (contagem de bactérias ácido-láticas, Número Mais Provável de coliformes a 30°C e a 45°C e contagem de mesófilos aeróbios) da água utilizada nas queijarias não cadastradas da mesorregião do Campo das Vertentes, nos períodos da chuva e da seca.
- Comparar o perfil físico-químico (pH, acidez titulável, proteína total, gordura, umidade e extrato seco total) de queijos Minas artesanais frescos da mesorregião de Campo das Vertentes, elaborados nos períodos da chuva e da seca.
- Pesquisar a presença de manipuladores de queijo Minas artesanais frescos portadores de *Staphylococcus* coagulase positivo.

- Avaliar a conformidade dos queijos Minas artesanais elaborados nos períodos das chuvas e da seca, bem como do leite cru e da água empregados nas queijarias, em relação aos parâmetros microbiológicos e físico-químicos estabelecidos pelas legislações estadual e federal.

- Relacionar a microbiota presente na água, no leite cru e no soro fermento com as características físico-químicas e microbiológicas do queijo Minas artesanal fresco de Campo das Vertentes, tanto no período das águas quanto no período da seca.

- Enumerar e identificar, ao nível de espécie, bactérias ácido-láticas da água, do leite cru, do soro-fermento e do queijo Minas artesanal fresco de Campo das Vertentes, na seca e na chuva, avaliando suas diversidades ecológicas.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1. Queijo

O queijo é um dos alimentos processados mais antigos registrados pela história da humanidade. Acredita-se que tenha sido originado na região entre os rios Tigre e Eufrates, no Iraque, há aproximadamente 8.000 anos (Fox e Mcsweeney, 2004).

A arte de elaboração do queijo remete a tempos pré-históricos, antes mesmo de o homem dominar a leitura ou a escrita. O seu aparecimento está ligado ao período de domesticação e criação de animais, principalmente cabras e ovelhas, e ao aproveitamento de seus produtos pelo homem, como forma de garantir sua sobrevivência.

Lendas à parte, a origem do queijo, e de outros derivados lácteos, é associada a uma combinação, ao acaso, da ação de enzimas gástricas de pequenos ruminantes no leite armazenado, sob sol quente e movimentos, intencionais ou não. Este arranjo teria proporcionado a separação efetiva do soro do leite e, conseqüente, formação de uma massa branca, o queijo (SEBRAE, 2008).

A difusão da arte do 'saber fazer' o queijo se deu de forma rápida em todo mundo, sobretudo, através da expansão do Império Romano, que disseminou para o continente europeu os segredos e as técnicas de produção de diversos queijos da Grécia. Ainda, na Europa, sob ação da Igreja Católica, durante a Idade Média, os queijos ganharam em qualidade e padrão, devido a produção de queijos finos restringidos aos mosteiros. Mais tarde, com a descoberta da pasteurização e o advento da Revolução Industrial, sua produção obteve grandes avanços e atingiu mercados mais distantes. Hoje, com a globalização, o queijo está presente em todo o mundo, podendo ser apreciado até mesmo por povos em que a cultura de consumo do queijo pouco existia ou era ausente, como os africanos e os asiáticos (Dalby, 2009).

Segundo a legislação brasileira, o queijo é o produto fresco ou maturado que se obtém por separação parcial do soro do leite ou leite reconstituído (integral, parcial ou totalmente desnatado), ou de soros lácteos, coagulados pela ação física do coalho, de enzimas específicas ou de outro fator coagulante, todos de qualidade apta para uso alimentar (Brasil, 1996).

Embora os Estados Unidos ocupem, hoje, o primeiro lugar na produção de queijos do mundo, produzindo quase 30% da produção mundial, foram na França, na Suíça e na Itália que os queijos assumiram papel de destaque no cenário gastronômico, como alimentos diferenciados e

de apreço incalculável. O Brasil produziu, em 2011, cerca de 45 mil toneladas, segundo as estatísticas internacionais (FAO, 2013). Dados locais revelaram que esta produção alcançou, no mesmo ano, 867 mil toneladas, cerca de 9,4% a mais que em 2010 (Associação..., 2012). A tendência, para os próximos anos, é de que a produção de queijos no Brasil aumente, pois a demanda, impulsionada pelo aumento no poder aquisitivo, por um alimento rico nutricional e sensorialmente, é notável. Este fato se comprova com o aumento do consumo do queijo. De acordo com dados da Associação Brasileira das Indústrias de Queijo (ABIQ), o consumo de queijo passou de 3,5 quilos *per capita* em 2008 para quase 5 quilos, no ano de 2014 (Associação..., 2014).

3.2. Queijos artesanais no Brasil

No Brasil, a produção de queijos artesanais iniciou-se no período colonial por portugueses que traziam consigo rebanhos bovinos. Parte da produção leiteira dos animais era destinada à elaboração de um queijo fresco, semelhante àquele da Serra da Estrela, de Portugal. A diferença entre o queijo português e aquele produzido no Brasil se deu basicamente pelo tipo de material usado para coagulação do leite. Em Portugal, eram utilizados extratos de flores e brotos de cardo silvestre (*Cynara cardunculus* L.), que, no Brasil, foram substituídos por estômago seco e salgado de mocó, bezerro ou cabrito (Ribeiro, 1959).

A forma artesanal de produzir o queijo se tornou uma alternativa segura de renda e de sobrevivência de pequenos produtores e contribuiu, assim, para o desenvolvimento das civilizações. Ao longo dos anos, a confecção dos queijos artesanais se estabeleceu com variações em todo o território brasileiro, devido as condições edafoclimáticas, econômicas e sócio-culturais particulares de cada região. Desde então, foi passada de geração a geração, representando uma importante herança cultural da nação.

São conhecidos como artesanais o queijo de Coalho e o queijo de Manteiga, produzidos na Região Nordeste; o queijo Serrano e o queijo Colonial, produzidos na Região Sul; o queijo Caipira, produzido no estado do Mato Grosso do Sul; e o queijo Minas artesanal, meia-cura, cabacinha e o requeijão artesanal no estado de Minas Gerais (Pereira 2007; Minas Gerais, 2012).

Os queijos artesanais brasileiros, embora apresentem características comuns, como a produção em pequena escala, familiar, muitas vezes sazonal e com limitado grau de tecnificação, exprimem práticas de elaboração e características sensoriais completamente distintas. Isso porque os queijos artesanais são resultantes do desenvolvimento do modo de fazer próprio na manipulação do leite, cru ou pasteurizado, dos coalhos, das massas, das formas de prensagem, da cura, e da tradição comercial. A esse modo de fazer acrescentam-se o tipo de alimentação fornecida aos animais, o grau de sangue do rebanho, a vegetação e tipo de relevo local, as condições climáticas e, por fim, a diversidade microbiológica presente no leite e no ambiente que irão conferir características peculiares a cada tipo de queijo, de acordo com a região onde é produzido (Meneses, 2006; Dores e Ferreira, 2012).

Sob o ponto de vista econômico, a produção de queijo artesanal é importante para dinamizar a economia em municípios de pequeno porte, constituindo em renda principal ou na complementação da renda das famílias, por contribuir para a circulação de dinheiro no próprio município e desacelerar o êxodo rural (Menezes, 2011). As unidades de produção de queijos artesanais se configuram como o principal mercado consumidor de leite do pequeno produtor,

proporcionando sustentabilidade e competitividade do sistema agroindustrial do leite da região onde é produzido (Nogueira Filho *et al.* , 2006). Em mercados especializados, um queijo artesanal de qualidade é altamente apreciado e pode atingir valor diferenciado.

3.2.1. Queijo Minas artesanal

Minas Gerais é o estado brasileiro que mais produz leite, cerca de 8,7 bilhões de litros, representando 27,1% da produção nacional (IBGE, 2011). É também o maior produtor de queijos do Brasil, processando, em 2001, 215 mil toneladas por ano, o que era equivalente a 50% da produção total do país (Martins, 2001).

Um dos mais antigos e tradicionais queijos do estado é o queijo Minas artesanal (QMA), sendo produzidas cerca de 29 mil toneladas/ano e mantendo na atividade mais de 25 mil produtores. A produção desse queijo está presente em mais de 600 dos 853 municípios do Estado e exerce grande importância para a economia e identidade sócio-cultural de Minas Gerais (Dores e Ferreira, 2012).

3.2.1.1. Histórico

A história do queijo mineiro remonta à chegada dos portugueses a Minas Gerais, no século XVIII, logo após a descoberta do ouro. Como os homens precisavam de um alimento que apresentasse período de conservação maior que o do leite, pelos longos trajetos percorridos, garimpeiros locais tentaram elaborar um queijo artesanal aos moldes do queijo Serra da Estrela, de Portugal (Pinto, 1979; Albuquerque, 1986). As condições climáticas serranas, bem como ingredientes adaptados da região, como o tipo de coalho e fermento utilizados, conferiram características diferenciadas e peculiares ao queijo produzido em Minas Gerais. À medida que estes exploradores percorriam novas áreas, a produção do queijo artesanal se espalhava por toda a extensão do estado (Martins, 2006).

Jean-Baptiste Debret, artista francês, chegou ao Brasil em 1816, para ser o pintor da família real. Realizou inúmeras expedições, em todo território nacional, no qual aproveitava para pintar a paisagem, a população e elementos da cultura brasileira. Em um de seus relatos, descreveu, precocemente, o queijo Minas artesanal, como um produto diferenciado servido à mesa do brasileiro após as refeições (Debret, 1976). Outro viajante, Auguste de Saint-Hilaire, naturalista francês, em passagem pelo Brasil, citou a produção de queijo Minas, no começo do século XIX, relatando a utilização de técnicas tradicionais até hoje presentes, como o uso de formas de madeira e de leite cru durante a elaboração do queijo e a prensagem manual e salga seca da massa (Saint-Hilaire, 1975).

Com a decadência da produção aurífera no estado, a agricultura e a pecuária passaram a ocupar lugares de destaque no cenário econômico e, desta forma, o queijo mineiro se estabeleceu como produto diferenciado que garantiu recursos para a região. Desde então, esse queijo se tornou parte da cultura de um povo, passada de geração para geração e um patrimônio a ser preservado, como um testemunho do passado e de uma maneira de viver (Furtado, 1980).

3.2.1.2. Aspectos legais de produção e comercialização

A segurança do queijo Minas artesanal (QMA) 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 regulamentação sobre os queijos artesanais (QA) ocorreu em 2000, por meio da resolução N° 7 do MAPA (Brasil, 2000). Este documento ratificou o exposto no Regulamento de Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal (RIISPOA) de que a comercialização de queijo elaborado a partir de leite cru seria permitida e regularizada pelo Serviço de Inspeção Federal (SIF) no queijo submetido a um tempo mínimo de 60 dias de maturação (Brasil, 1952). Esta medida levou a grande insatisfação por parte dos produtores, que alegavam que este período de maturação ocasionaria perda das características sensoriais tradicionais do queijo, além de aumentar os custos com a estocagem do produto. No intuito de resguardar a produção artesanal do queijo Minas e garantir a segurança dos consumidores, o governo estadual de Minas Gerais, elaborou e publicou a Lei n°14.185, de 31 de janeiro de 2002, pioneira no assunto, que dispõe sobre o processo de produção do queijo Minas artesanal (QMA) (Minas Gerais, 2002b). Essa lei, regulamentada pelo Decreto n° 42.645, de 05 de junho de 2002 (Minas Gerais, 2002a) definiu normas de fabricação, de embalagem e de transporte do QMA, estabelecendo-se ainda a obrigatoriedade de certificação de qualidade dos produtores e o cadastramento oficial das queijarias pelo Instituto Mineiro de Agropecuária (IMA).

Em Dezembro de 2006, foi lançada a portaria n° 818 que propôs um Regulamento Técnico para produção do queijo Minas artesanal e estabeleceu punições para aqueles que descumprirem-na (Minas Gerais, 2006). Mais tarde, o Decreto n° 44.864, de 01 de agosto de 2008 (Minas Gerais, 2008) alterou alguns parâmetros físico-químicos e microbiológicos do QMA já existentes. A partir desse decreto, o QMA deixou de ser enquadrado como um queijo de alta umidade pela legislação federal e passou a ter padrões idênticos aos queijos de média umidade (entre 36 e 45,9%) (Brasil, 1996).

Apesar de todas estas leis representarem uma melhoria na produção do queijo Minas artesanal, os 60 dias de maturação e o impedimento da comercialização em outros estados brasileiros foram mantidos, fazendo com que alguns produtores mineiros continuassem a comercializar sua produção na clandestinidade (Dores e Ferreira, 2012). A grande evolução para a ampliação de mercado do QMA veio mais tarde com a publicação da Instrução Normativa n° 57 em 16 de dezembro de 2011 pelo MAPA (Brasil, 2011) que permitiu a comercialização de queijos artesanais com período de maturação inferior a 60 dias, contrariando a determinação anterior dada pelo RIISPOA (Brasil, 1952). Contudo, a produção ficava restrita a queijarias situadas em regiões certificadas ou tradicionalmente reconhecidas e na unidade produtora de leite cru.

Sob alegação da dificuldade dos produtores em se adaptarem aos padrões de produção e de qualidade estabelecidos para o registro sanitário do produto, em 18 de Dezembro de 2012, foi publicada a lei estadual 20.549 que revoga a Lei n° 14.185, de 2002. Esta lei dispõe sobre a produção e a comercialização dos queijos artesanais de Minas Gerais e, entre as novas medidas, destacam-se o reconhecimento de novas variedades de queijos artesanais de leite cru, como o meia-cura, o cabacinha e o requeijão artesanal e a proposta de um termo de compromisso para adequação sanitária do produtor. Também são abordados, o reconhecimento e a regulamentação dos queijeiros na atuação no mercado e a autorização do poder público de subsidiar os exames de tuberculose e brucelose das matrizes leiteiras, bem como a reposição de vacas sacrificadas

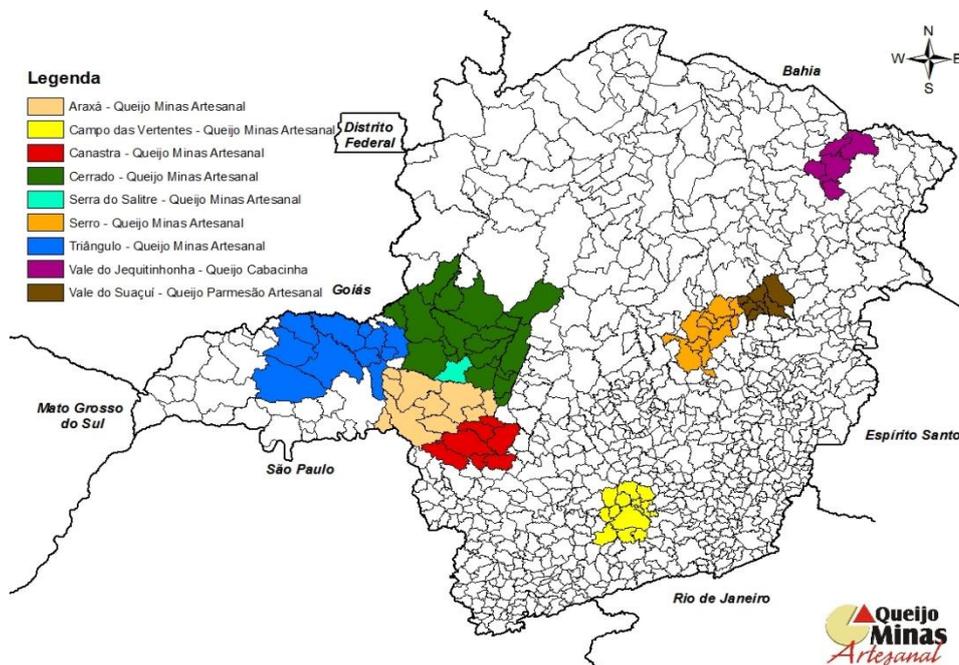
por serem portadoras dessas doenças. Determinou-se, ainda, a necessidade de realização de estudos técnico-sanitários em queijarias no estado para a regulamentação, para cada variedade de queijo, dos parâmetros físico-químicos e microbiológicos, dos prazos de validade e de maturação, quando couber, das características técnicas das instalações, dos equipamentos e dos utensílios e das boas práticas de fabricação e higiene operacional (Minas Gerais, 2012).

Após o reconhecimento da equivalência do Serviço de Inspeção de Produtos de Origem Animal do IMA, para adesão ao Sistema Brasileiro de Inspeção de Produtos de Origem Animal (SISBI-POA), através da publicação da portaria de nº 366 pelo MAPA (Brasil, 2012a), os esforços do estado intensificaram para modificar a situação dos queijos artesanais, uma vez que esta portaria criou condições para que os produtos com o selo de Serviço de Inspeção Estadual, inspecionados pelo IMA, pudessem ser comercializados em todo o território nacional com equivalência ao selo do Serviço de Inspeção Federal (SIF). Nesse sentido, em 30 de abril de 2013, entrou em vigor a portaria estadual de nº 1305 que determina tempos mínimos de maturação para o queijo Minas artesanal produzido a partir de leite cru e com a utilização de pingo (Minas Gerais, 2013a). Quatro meses depois, atendendo à demanda da opinião pública, o governo federal publicou a Instrução Normativa nº 30, que revogou a Instrução Normativa nº57. Por esta nova normativa, os queijos artesanais elaborados a partir de leite cru podem ser maturados por um período inferior a 60 (sessenta) dias em queijaria situada em região de indicação geográfica registrada ou tradicionalmente reconhecida e em propriedade certificada como livre de tuberculose e brucelose, de acordo com o disposto no Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose Animal (PNCEBT), ou controladas para brucelose e tuberculose pelo Órgão Estadual de Defesa Sanitária Animal (Brasil, 2013).

O programa Queijo Minas Artesanal, promovido pelo IMA, regulariza a situação dos queijos tradicionais no estado. Ao IMA, cabe a função de certificar as condições higiênico-sanitárias necessárias para a produção do queijo Minas artesanal, observando a higiene pessoal, o processo da ordenha, a elaboração do queijo Minas Artesanal, a armazenagem e o transporte para comercialização, bem como a sanidade do rebanho. Atenção especial deve ser dada ao controle de mastite, com a realização de exames periódicos para detecção da doença clínica e subclínica, além de análise do leite em laboratório da Rede Brasileira de Qualidade do Leite. Para cadastramento, o responsável ainda deve apresentar os seguintes documentos: exame médico e teste de tuberculose dos trabalhadores, comprovante de vacinação do rebanho contra raiva, brucelose e febre aftosa, cópia do cartão de controle sanitário, atestado negativo de teste contra brucelose e tuberculose do rebanho, análise microbiológica e físico-química da água e do queijo, planta baixa da propriedade, formulário de compromisso preenchido e modelo do rótulo do queijo (Minas Gerais, 2012).

A partir de outubro de 2013, com a publicação da Portaria 1356, todos os estabelecimentos a serem registrados no serviço de inspeção do IMA serão inseridos no (SISBI/POA). Para os produtores anteriormente registrados, fica facultativa a adesão ao SISBI/POA, desde que cumpram os pré-requisitos básicos para tal (Minas Gerais, 2013b).

O IMA reconhece, até o presente momento, sete regiões tradicionalmente produtoras de queijo Minas artesanal, sendo elas: Serro, Cerrado, Araxá, Serra da Canastra, Campo das Vertentes e mais, recentemente, o Triângulo Mineiro e Serra do Salitre (figura 1) (Minas Gerais, 2002f; Minas Gerais, 2003a; Minas Gerais, 2003b; Minas Gerais, 2004; Minas Gerais, 2009; Minas Gerais, 2014a; Minas Gerais, 2014b).



Fonte: Empresa..., 2014¹

Figura 1. Mapa dos queijos artesanais de Minas Gerais.

3.2.1.3. Caracterização e forma de produção

Com pequenas diferenças, tratadas como “segredos bem guardados”, cada fazenda produtora de queijo Minas artesanal busca dar uma especificidade ao seu produto (Meneses, 2006). Apesar destes queijos serem elaborados basicamente com a mesma tecnologia, cada queijo apresenta características físicas e sensoriais distintas e peculiares conforme a tradição histórica e cultural da região do Estado onde foi produzido (Resende, 2010). Símbolo da identidade mineira e brasileira, em 15 de Maio de 2008, o modo artesanal de fazer o queijo Minas artesanal foi aclamado como patrimônio imaterial brasileiro pelo Conselho Consultivo do Instituto do Patrimônio Histórico e Artístico Nacional (IPHAN, 2008).

O queijo Minas artesanal deve ser elaborado em propriedade leiteira, a partir do leite cru, integral, recém-ordenhado de vaca, obtido de um rebanho sadio e que atenda aos padrões de qualidade exigidos pela legislação estadual vigente. São utilizadas, em sua produção, técnicas tradicionais, ficando proibida a utilização de técnicas industriais, como ultrafiltração do leite, prensagem mecânica, emprego de leite concentrado ou em pó e proteínas lácticas. Deve ainda ser elaborado no interior de queijarias artesanais situadas em propriedade rural, destinadas exclusivamente à produção deste queijo (Minas Gerais, 2012).

As queijarias devem possuir áreas para recepção e armazenagem do leite, área de fabricação, de maturação e de embalagem e expedição e disporem de água para limpeza e higienização de suas instalações. Devem ainda estar localizadas distante de pocilgas e galinheiros, possuírem impedimento, por meio de cerca, do acesso de animais e de pessoas estranhas à produção e

¹ Figura cedida pela Empresa de Assistência Técnica e Extensão Rural- Minas Gerais, no ano de 2014, via e-mail.

serem construídas em alvenaria, segundo normas técnicas a serem estabelecidas em regulamento. Quando instalada junto ao estábulo ou local de ordenha, as queijarias devem possuir instalações, como torneiras higiênicas, independentes das usadas nos animais (Empresa..., 2009; Minas Gerais, 2012).

No processo de elaboração do queijo, além do leite cru como ingrediente obrigatório, são utilizados o sal e culturas lácticas naturais ou fermento endógeno, popularmente conhecido como “pingo”. O “pingo” é a fração do soro fermentado salgado originado do dessoramento de queijos produzidos no dia anterior, que é coletada e utilizada como fermento no queijo produzido na próxima batelada.

A produção do QMA deve ser iniciada, no máximo, noventa minutos após o começo da ordenha e é desenvolvida com a observância das seguintes fases: filtração do leite, adição de cultura láctica e coalho, coagulação, corte da coalhada, mexedura, dessoragem, enformagem, prensagem manual, salga seca e maturação (figura 2) (Minas Gerais, 2012). Nesse processo, o leite cru, recém obtido por ordenha mecânica ou manual, é filtrado e encaminhado para o interior da sala de processamento da queijaria, onde, então, é acondicionado em tanques para o início da produção. O coalho e fermento endógeno são adicionados ao leite e, após sua coagulação, que acontece em cerca de 30 a 40 minutos, inicia-se, o corte da coalhada com o auxílio de uma pá, régua ou lira rústica. A mexedura cuidadosa da massa, em seguida, acelera o processo de dessoragem. Esta massa é, então, colocada em formas plásticas e, com o auxílio ou não de pano, é pressionada manualmente pelo queijeiro, para eliminação do soro residual e modelamento da forma final do queijo. A massa, ainda enformada, recebe a primeira salga, de sal fino ou grosso, em uma das superfícies. O queijo, após cerca de 12 horas, é virado e a outra superfície recebe uma camada de sal. Nesse período, o pingo é coletado. Com 24 horas, o queijo é retirado da forma, o excesso de sal é descartado, e o produto segue para as prateleiras, em sala anexa, onde deve permanecer para maturação (Costa Júnior *et al.* , 2009; Minas Gerais, 2012; Moreno, 2013; Oliveira 2014).

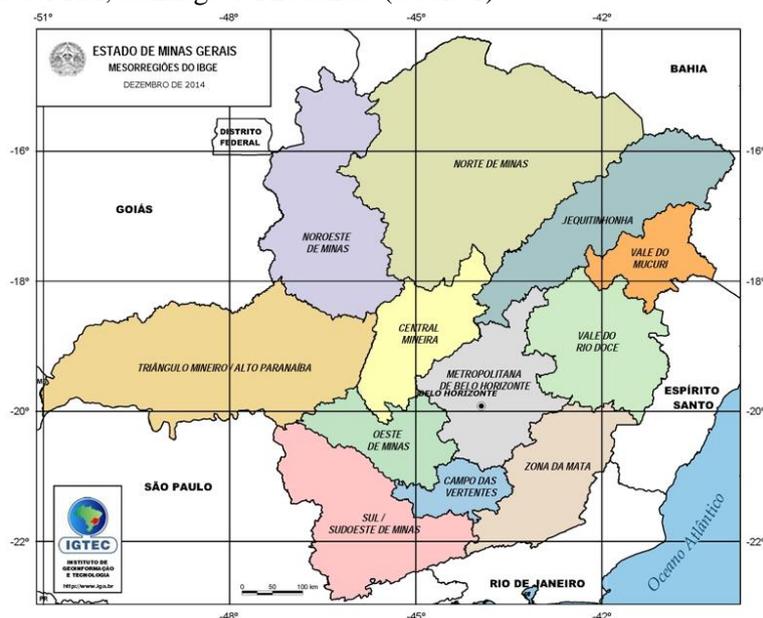


Adaptado de: Costa Júnior *et al.* , 2009; Minas Gerais, 2012; Moreno, 2013; Oliveira, 2014
 Figura 2. Fluxograma de produção de queijo Minas artesanal.

3.2.1.4. Campo das Vertentes como região produtora

De acordo com a divisão territorial proposta pelo Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), o Estado de Minas Gerais divide-se em 12 mesorregiões e 66 microrregiões (IBGE, 2010a) (figura 3). Campo das Vertentes é uma destas doze mesorregiões e, em função do Programa de Queijo Minas Artesanal, a região passou a ser considerada como microrregião produtora deste queijo, por meio da publicação da Portaria nº 1.022, em 2009 pelo IMA (Minas Gerais, 2009). A região possui, até o presente momento, apenas quatro produtores cadastrados neste programa do IMA e, em contrapartida, um número cada vez maior de produtores em busca do cadastramento e certificação de suas queijarias.

De acordo com estudos históricos, agroecológicos e de condições de solo e clima, dos 35 municípios de Campo das Vertentes, distribuídos em três microrregiões, São João del-Rei, Barbacena e Lavras, quinze são autorizados a produzir o QMA, sendo eles: Barroso, Conceição da Barra de Minas, Coronel Xavier Chaves, Carrancas, Lagoa Dourada, Madre de Deus de Minas, Nazareno, Prados, Piedade do Rio Grande, Resende Costa, Ritápolis, Santa Cruz de Minas, São João del-Rei, Santiago e Tiradentes (tabela 1).



Fonte: Estado... 2014

Figura 3. Mapa com as mesorregiões de Minas Gerais.

Tabela 1. Microrregiões da mesorregião de Campo das Vertentes, seus municípios e municípios autorizados pelo programa queijo Minas artesanal

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

Fonte: IBGE, 2010a; Minas Gerais, 2009

Campo das Vertentes se destacou precocemente como região produtora de leite e queijos, ainda no século XVIII. Após o declínio da exploração do ouro, a agricultura e pecuária ganharam espaço no cenário econômico, como principais atividades geradoras de recursos para a capitania. Com um ambiente rico para a produção de QMA, caracterizado por solo fértil, grandes rebanhos leiteiros e numerosos cursos d'água, além do fato de sua localização geográfica ser um facilitador de transações comerciais, Campo das Vertentes assumiu, rapidamente, o papel de grande centro comercial da capitania, no qual o queijo se tornou o principal alimento de compra e venda (Saint-Hilaire, 1974, Lemos, 2009).

A região é responsável pela produção de 313,512 mil litros de leite, cerca de 4 % do montante total do estado, e tem a melhor produtividade estadual por animal, correspondente a 2.049 litros por vaca por ano, revelando o grande potencial desta mesorregião (IBGE, 2010b). Dentre os dez produtos com maior frequência de produção na região, seis são queijos (Dusi e Assis, 2011).

Além de uma expressiva aptidão leiteira, a região de Campo das Vertentes é também um importante polo turístico, o que contribui para a manutenção local da tradição de elaboração do queijo Minas artesanal. Apesar desta importância histórica e cultural do QMA na região, há uma escassez de dados, na literatura, relacionados à qualidade microbiológica e físico-química do queijo elaborado em Campo das Vertentes, em especial, dos elaborados por produtores não cadastrados no Serviço de Inspeção Estadual que almejam o cadastramento e a comercialização de seus produtos no mercado nacional.

3.2.1.5. Influência da maturação e período do ano

Uma das formas de melhorar a qualidade microbiológica de um queijo é a maturação, uma vez que ela favorece a combinação de fatores físicos, químicos e microbiológicos considerados fundamentais para a estabilidade e segurança do queijo (Beresford *et al.*., 2001). Essas transformações se processam tanto na periferia como no interior da massa, sob a ação de enzimas lipolíticas e proteolíticas, a maior parte de origem microbiana, sendo um fenômeno bastante complexo que determinará, de acordo com a sua duração, as características sensoriais e físicas de cada tipo de queijo (Santos, 2010; Perry, 2004).

Na literatura internacional, várias são as publicações sobre queijos artesanais e o papel da maturação na segurança desses queijos (Kongo *et al.*., 2009; Bertolino *et al.*., 2011). Entretanto, no Brasil, poucas são as pesquisas sobre o assunto.

Estudos em queijos frescos revelam uma alta contagem de micro-organismos potencialmente patogênicos, principalmente *Staphylococcus aureus*, em valores muito próximos dos requeridos para a produção de enterotoxinas capazes de causar danos a saúde do consumidor (Almeida Filho e Nader Filho, 2000; Loguercio e Aleixo, 2001; Salotti *et al.*., 2006; Senger e Bizani, 2011). Por outro lado, estudos em queijos Minas artesanais (QMA) demonstram que esses mesmos micro-organismos, potencialmente patogênicos, como *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*, podem ser controlados pelo processo de maturação, apresentando contagens baixas no queijo maturado por 60 dias, próximas a 10^1 UFC/g (Martins, 2006; Dores, 2007).

Uma grande variedade de micro-organismos participa do processo de maturação dos queijos: as bactérias ácido-láticas (BAL), representantes do grupo de micro-organismos iniciadores da fermentação do leite, e as BAL não iniciadoras, como as espécies mesofílicas *Pediococcus* spp. e *Lactobacillus* spp. e outros micro-organismos como *Micrococcus* spp., *Brevibacterium* spp.,

bactérias propiônicas, corineformes, bolores e leveduras, representantes da microbiota secundária do queijo (Nóbrega, 2007). Estes micro-organismos são desejáveis ao processo de elaboração do QMA, pois além de alguns fermentarem a lactose e produzirem ácido lático, inibindo o crescimento de micro-organismos indesejáveis, são também responsáveis pela proteólise e lipólise da massa, gerando compostos químicos que influenciam no *flavor*, na textura e na cor do QMA. Entre os principais componentes resultantes do processo de maturação estão os aminoácidos, aminas, ácidos, tióis, tioésteres de proteínas; ácidos graxos, metilcetonas, lactonas e ésteres de lipídeos; ácidos orgânicos, como lático, acético e propiônico; dióxido de carbono, ésteres e alcoóis da lactose (Pinto, 2004; Dores, 2007; Santos, 2010).

Durante a maturação, muitos são os fatores que limitam o crescimento de micro-organismos indesejáveis no queijo, como temperatura, potencial redox, atividade de água, pH e a atividade antimicrobiana de bactérias lácticas (Vasconcelos e Melo Filho, 2010). Estudos demonstram uma grande importância da temperatura de maturação no direcionamento de uma fermentação desejável no queijo Minas artesanal. Seus resultados revelam que a maturação sob temperatura de refrigeração não é suficiente para reduzir a microbiota patogênica a limites legais inferiores, gerando queijos com 64 dias de maturação de baixa qualidade microbiológica e descaracterizados sensorialmente (Martins, 2006; Dores, 2007). A manutenção desses micro-organismos indesejáveis no queijo decorre, principalmente, da inibição de bactérias ácido-láticas e de suas reações enzimáticas quando este é submetido precocemente a temperatura de refrigeração. De forma oposta, a maturação à temperatura ambiente favorece a fermentação láctica que resulta na inibição de micro-organismos contaminantes no queijo (Dores e Ferreira, 2012). É, dessa forma, decisiva para o atendimento aos aspectos microbiológicos indicados pela legislação brasileira e indispensável para a segurança alimentar desse queijo.

O período mínimo de maturação do QMA capaz de torná-lo seguro ao consumidor não é bem definido. Segundo a legislação mineira, estudos técnico-sanitários devem ser realizados em queijarias no estado, garantida a participação de representantes de produtores de queijos artesanais e, então, submetidos à apreciação em câmara específica do Conselho Estadual de Política Agrícola, CEPA (Minas Gerais, 2012). O objetivo é subsidiar, para cada variedade de queijo, a regulamentação para a determinação do prazo ideal de maturação. Martins (2006) e Dores (2007) acompanharam o processo de maturação dos QMA das regiões do Serro e da Serra da Canastra, respectivamente. Aos 22 dias de maturação, à temperatura ambiente, o queijo da Serra da Canastra atingiu os limites de segurança microbiológica, ao passo que na região do Serro esses limites foram atingidos mais precocemente, nas mesmas condições de temperatura, aos 17 dias, sendo esta maturação decisiva para eliminação da *Salmonella* spp. aos 15 dias. Os autores destes trabalhos sugerem que essa diferença no tempo ideal de maturação entre as regiões da Canastra e Serro, além de ser atribuída às características físico naturais distintas entre as duas regiões, resulta do processo de prensagem manual da massa. No Serro, essa prensagem é realizada sem auxílio de tecido o que favorece a redução de umidade, maior concentração de lactose no queijo e, portanto, maior produção de ácido pelas bactérias ácido-láticas, o que desfavorece o desenvolvimento de patógenos (Dores e Ferreira, 2012).

O período do ano é determinante na qualidade no queijo Minas artesanal. Isto se deve, principalmente, às diferenças observadas quanto às temperaturas médias e umidade relativa do ar entre o período chuvoso e seco. Sabe-se, por exemplo, que o queijo produzido no período seco, por ser elaborado e maturado a baixa temperatura e baixa umidade, desfavorece o crescimento de micro-organismos deteriorantes e/ou patogênicos. Resultados confirmando menores contagens em maturação no período da seca foram observados em queijo Minas

artesanal do Serro (Martins, 2006). Contrariamente, queijos elaborados durante o período chuvoso, devido as altas temperatura e umidade do ar, também elevada, apresentam maiores contagem microbiológicas, como mostram os resultados encontrados em queijo Minas artesanal da Serra da Canastra e de Campo das Vertentes (Dores *et al* ., 2013; Oliveira, 2014).

A influência do período do ano na qualidade do QMA também advém de variações observadas na qualidade do leite e da água empregados na elaboração do queijo, que também são comumente mais contaminados durante o período chuvoso. Sob o ponto de vista físico-químico, a composição do queijo é fortemente influenciada pela composição do leite, em especial o teor de gordura, proteína, lactose e contagem de células somáticas. Durante a época das águas, há um aumento de casos de mastite no rebanho, com elevação de CCS e, conseqüente redução de lactose no leite (Bueno, 2005). Neste mesmo período, devido ao maior aporte forrageiro aos animais, tem-se uma elevação nos teores de gordura e proteína no leite e, conseqüentemente, no queijo (Larsen *et al* ., 2010).

3.2.1.6. Boas Práticas de Fabricação e Boas Práticas Agropecuárias

As Boas Práticas de Fabricação (BPF) são um conjunto de normas adotadas pelos estabelecimentos elaboradores de alimentos a fim de garantir a qualidade sanitária e a conformidade dos produtos alimentícios com a legislação vigente (Brasil, 1997a; Brasil, 1997b). Essas recomendações abordam os procedimentos realizados quanto à higienização de instalações, equipamentos e utensílios, controle de pragas e vetores, segurança da água, saúde e hábitos higiênicos dos colaboradores e prevenção da contaminação cruzada (Pinto *et al* ., 2009).

Para produção do queijo Minas artesanal (QMA), as BPF são abordadas em três portarias promulgadas pelo IMA: Portaria n° 517, de 14 de junho de 2002, que estabelece normas de defesa sanitária para rebanhos fornecedores de leite para a produção de QMA (Minas Gerais, 2002c); Portaria n° 518, de 14 de junho de 2002, que dispõe sobre requisitos básicos das instalações, materiais e equipamentos para a fabricação do QMA (Minas Gerais, 2002d) e Portaria n° 523, de 3 de julho de 2002, que estabelece normas sobre as condições higiênico-sanitárias e as boas práticas de manipulação e fabricação do QMA (Minas Gerais, 2002e).

Complementares as boas práticas adotadas durante a elaboração do produto, as Boas Práticas Agropecuárias (BPA) buscam o estabelecimento de procedimentos, processos, controles e precauções com o intuito de atingir um determinado padrão de identidade e qualidade da matéria-prima (Empresa...2009). Esses procedimentos são capazes de reduzir a contaminação microbiana e/ou física e/ou química do leite. Quanto à contaminação microbiana, as BPA fundamentam-se na exclusão, remoção, eliminação e inibição da multiplicação de microorganismos indesejáveis e/ou corpos estranhos e que devem ser implantadas em toda a cadeia produtiva (Fonseca, 2004).

A adoção conjunta das BPF e BPA, por todos os elos envolvidos na cadeia produtiva do queijo Minas artesanal, garante, desta forma, produtos de qualidade mais elevada. Diagnósticos das regiões produtoras de QMA (Araújo, 2004; Pinto *et al* ., 2009) indicaram a necessidade de adequações estruturais das propriedades e das BPF para melhoria da qualidade dos queijos produzidos nestas regiões. Os autores constataram não-conformidade e contaminação microbiana no leite cru em um grande número de propriedades rurais, assim como no queijo recém produzido e na água de consumo. Intervenções nesses aspectos foram consideradas

prioritárias para propiciar um queijo maturado com qualidade dentro dos prazos definidos. Por outro lado, quando Azevedo *et al.* (2004) analisaram queijos Minas artesanais produzidos por nove produtores do Alto Paranaíba-MG, que eram cadastrados no Serviço de Inspeção e assistidos pela EMATER, foi constatado que todas (100%) apresentaram contagens dentro dos padrões legais para coliformes termotolerantes. Esses produtores faziam parte de um programa estadual, pelo qual eram educados e assistidos em todas as etapas de produção, desde manejo sanitário dos animais e higiene na ordenha até instalações e boas práticas de produção. Os autores concluíram que queijos elaborados com leite cru, quando produzidos com matéria prima proveniente de animais sadios e com práticas de higiene adequadas, não representam perigo à saúde pública.

3.3. Qualidade microbiológica e físico-química da água

Segundo Amaral *et al.* (2007), a qualidade da água utilizada na produção e manipulação de alimentos é constantemente negligenciada. Porém, a água de má qualidade microbiológica pode ser uma fonte de micro-organismos que tanto podem promover a deterioração dos alimentos como causar enfermidades na população consumidora. Na região de Campo das Vertentes, pouca informação se tem a respeito da qualidade microbiológica e físico-química da água utilizada nas queijarias artesanais, sobretudo, em propriedades cujos produtores não são cadastrados no Serviço de Inspeção Estadual.

Segundo a legislação estadual, a água utilizada na elaboração do queijo artesanal deve ser potável e poderá provir de nascente, de cisterna revestida e protegida do meio exterior ou de poço artesianos. Deve ainda ser canalizada desde a fonte até a caixa d'água da queijaria e tratada por sistema de filtração e cloração. A queijaria deve dispor de água para a limpeza e a higienização de suas instalações na proporção de cinco litros para cada litro de leite processado, sendo necessária a realização periódica das análises físico-químicas e bacteriológicas desta água (Minas Gerais, 2012).

Entre os micro-organismos veiculados pela água que contribuem para a contaminação do leite e, conseqüentemente, do queijo, destacam-se além dos coliformes como *Escherichia coli*, os patogênicos como *Pseudomonas aeruginosa*, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* spp., *Staphylococcus* enterotoxigênicos, entre outros. Por outro lado, a água também pode ser veículo de bactérias ácido-láticas para o QMA, sendo assim, fonte de micro-organismos desejáveis ao produto (Ortalini, 2009).

Os parâmetros microbiológicos de avaliação da qualidade de água encontram-se na tabela 2.

Tabela 2. Parâmetros microbiológicos estabelecidos para inspeção de água utilizada na produção de queijo Minas artesanal

Parâmetros microbiológicos	Critério de inspeção
Pesquisa de coliformes 30° (NMP/100mL)	Ausência
Pesquisa de coliformes 45° (NMP/100mL)	Ausência
Contagem padrão em placas (UFC/mL)	≤ 500

Fonte: Minas Gerais, 2002b; Minas Gerais, 2008; Brasil, 2012b

A qualidade de água de queijarias de produtores cadastrados na região de Campo das Vertentes – MG foi estudada por Oliveira (2014), em duas estações do ano. A contagem média de coliformes a 30°C, tanto na chuva quanto na seca, foi de 3,6 NMP/100mL. Para coliformes a 45°C, a contagem média foi, também para os dois períodos, igual a < 3NMP/100mL. Já para mesófilos aeróbios, foram encontradas contagens médias iguais a <1 UFC/mL no período seca e a 2,7x10³ UFC/mL no período chuvoso. Ainda neste trabalho, pesquisou-se a presença de BAL na água das queijarias. No meio MRS, as contagens foram de <1 UFC/mL e 5 UFC/mL na seca e na chuva, respectivamente, enquanto que no meio M17 foram de 4 UFC/mL e <10 UFC/mL.

Santos (2010) ao avaliar a qualidade da água usada da elaboração de queijo Minas artesanal do Serro encontrou que 100% amostras de água estavam dentro dos padrões exigidos pela legislação para *Escherichia coli* e fora dos padrões para coliformes a 30°C, com contagens entre 10¹ UFC/mL e 1,2x10² UFC/mL. Em outro estudo na mesma região, as contagens de coliformes totais em amostras de água utilizadas nas queijarias artesanais variaram de <1 UFC/mL a 5 UFC/mL no, período da seca, e de <1 UFC/mL a 44 UFC/mL, no período das águas. Para coliformes termotolerantes, os resultados ficaram entre < 1 e 3 UFC/mL e < 1 e 14 UFC/mL nos mesmos períodos, respectivamente (Martins, 2006).

Borelli *et al.* (2006a) analisaram a qualidade microbiológica da água utilizada na fabricação do queijo Minas artesanal da região da Canastra e encontraram contagens iguais ou superiores a 16 NMP/100mL de coliformes a 30°C e contagens entre 2,2 NMP/100mL e >16 NMP/100mL de *Escherichia coli*. Em Araxá, as contagens de coliformes 30°C e *Escherichia coli* em amostras de água de abastecimento de queijarias artesanais variaram de 0 UFC/mL a 5,4x10³ UFC/mL e 0 a 5x10¹ UFC/mL, respectivamente (Araújo, 2004).

As características físico-químicas da água, como a dureza e pH, são também de suma importância na produção do QMA, uma vez que afetam a limpeza e desinfecção dos equipamentos e utensílios usados tanto na ordenha do animal quanto dentro da queijaria, impactando na eficiência destes processos, além de diminuir a vida útil dos equipamentos. A deficiência nos processos de desinfecção e limpeza, por sua vez, pode levar a formação de incrustações nas instalações e perda da qualidade do produto final com a formação de biofilmes, pelo crescimento de bactérias, que podem levar, até mesmo, a produção de toxinas que serão incorporadas ao produto final (Kamiyama, 2012).

Os parâmetros físico-químicos para avaliação da qualidade de água encontram-se na tabela 3.

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

Parâmetros físico-químicos	Critério de inspeção
Dureza (mg/L)	≤ 300
pH	6,0 a 9,5
Cloro Residual (ppm)	2 a 3

Fonte: Minas Gerais, 2002b; Minas Gerais, 2008, Brasil, 2012b

Em estudo realizado em queijarias artesanais da região de Araxá, os valores de pH encontrados na água de abastecimento variaram entre 4,91 e 7,8, sendo a média igual a 6,62 (Araújo, 2004).

3.4. Qualidade microbiológica do soro-fermento

Uma característica peculiar na produção de queijo Minas artesanal (QMA) é que não são utilizadas culturas iniciadoras comerciais. Este papel é desempenhado principalmente pelas bactérias ácido-láticas (BAL), provenientes do ambiente, do leite cru e do soro-fermento, tradicionalmente conhecido como pingão, nas regiões produtoras desse queijo.

O soro-fermento é responsável pelas características sensoriais tradicionais e peculiares ao queijo Minas artesanal. Sua microbiota é diversificada, representativa da região na qual o produto é elaborado (Dores e Ferreira, 2012). Em geral, este soro-fermento apresenta uma elevada população de bactérias lácticas, sendo atribuído a este fato, o controle de patógenos como *Listeria monocytogenes* e *Salmonella* spp. em queijos Minas artesanais (Santos, 2010). Como a quantidade de fermento adicionado ao leite pode variar de fazenda para fazenda, diferentes concentrações de bactérias ácido-láticas são encontradas na massa do queijo, causando variações nos efeitos desejáveis desses micro-organismos (Machado *et al.* , 2004). Não há, na legislação atual, padrões de qualidade para essa matéria-prima.

Por outro lado, o soro-fermento também pode ser fonte de micro-organismos indesejáveis ao queijo. Martins (2006) ao analisar a qualidade microbiológica do pingão utilizado na produção de queijo Minas artesanal do Serro encontrou altas contagens de coliformes totais, *Escherichia coli* e *Staphylococcus* spp. Estes valores foram de $1,2 \times 10^3$ UFC/mL, $1,5 \times 10^2$ UFC/mL e $2,9 \times 10^2$ UFC/mL, respectivamente, para o período da seca e de $2,3 \times 10^3$ UFC/mL, $1,7 \times 10^2$ UFC/mL e $2,6 \times 10^2$ UFC/mL, para o período das águas. Não houve diferença ($p > 0,05$) entre os períodos estudados.

Leite *et al.* (1995), em estudo sobre culturas lácticas provenientes do soro-fermento resultante da elaboração de queijo-de-Minas curado da região do Serro, identificaram por métodos bioquímicos bactérias pertencentes aos gêneros *Lactococcus* spp. e *Streptococcus* spp., sendo as espécies predominantes: *Lactococcus lactis* subs. *lactis*, *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*, *Streptococcus mileri* e *Streptococcus faecalis*. Em outra pesquisa realizada com o soro-fermento usado na elaboração de queijo Minas artesanal da mesma região foram observadas altas contagens de mesófilos, cujos valores variaram entre 4×10^4 UFC/mL e $1,5 \times 10^8$ UFC/mL. Por outro lado, também foram observadas contagens elevadas de bactérias ácido-láticas (BAL), entre $6,5 \times 10^6$ UFC/mL e $3,3 \times 10^7$ UFC/mL, ficando evidente que esse grupo compõe a microbiota dominante do soro-fermento desta região (Santos, 2010).

Em trabalho realizado com soro-fermento da região da Serra da Canastra, Borelli *et al.* (2006a) encontraram contagens de coliformes a 30°C variando de 93 a >1100 NMP/mL, enquanto que para coliformes fecais esta variação foi de 9 a 1000 NMP/mL. Ainda neste estudo, foram relatadas contagens altas para *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus* spp., em valores de 10^2 UFC/mL a $1,6 \times 10^5$ UFC/mL e de $1,6 \times 10^3$ UFC/mL a $6,3 \times 10^5$ UFC/mL, respectivamente. Na mesma região, contagens inferiores de *Staphylococcus aureus* foram descritas no soro-fermento avaliado em dois períodos do ano. No período chuvoso, a contagem média de *Staphylococcus aureus* de $8,9 \times 10^1$ UFC/mL foi igual ($p > 0,05$) a média de 5×10^1 UFC/mL encontrada no período seco (Dores *et al.* , 2013).

Em estudo realizado em soro fermento usado na elaboração de queijo Minas artesanal de propriedades não cadastradas, localizadas na região da Serra da Canastra, a contagem média de bactérias ácido-láticas foi de $3,0 \times 10^7$ UFC/mL no ágar MRS e de $1,0 \times 10^8$ UFC/mL no M17.

Lactococcus foi o gênero de BAL mais frequentemente isolado nestas amostras e *Lactobacillus plantarum* a espécie mais frequente (Resende, 2010). Resultado semelhante foi reportado por Borelli *et al.* (2006a), em amostras de soro-fermento usado no processo de elaboração de queijo Minas curado da mesma região. Já soro-fermento do queijo Minas artesanal Canastra em Medeiros MG apresentou-se rico em *Enterococcus avium* e *Enterococcus faecium* (Araújo, 2008).

Em pesquisa avaliando a contagem de bactérias ácido-láticas em soro-fermento de queijo Minas artesanal da Serra da Canastra foram encontradas medianas de $3,5 \times 10^5$ UFC/mL e $1,2 \times 10^7$ UFC/mL nos períodos de seca e chuvas, respectivamente. No mesmo trabalho, contagens de bolores e leveduras variaram entre $1,5 \times 10^4$ UFC/mL e $1,7 \times 10^5$ UFC/mL. Ambos os parâmetros estudados não apresentaram diferença ($p > 0,05$) entre os dois períodos de produção analisados (Nóbrega, 2007).

Em soro-fermento para produção de queijo Minas artesanal da Serra do Salitre, contagens de bolores e leveduras apresentaram valores mínimos e máximos de 3×10^4 UFC/mL e $2,7 \times 10^5$ UFC/mL (Lima *et al.*, 2009). Em Campo das Vertentes, Oliveira (2014), ao analisar o soro-fermento usado na elaboração de queijo Minas artesanal, relatou contagens médias de $4,6 \times 10^5$ UFC/mL de bolores e leveduras, no período da seca, e $1,1 \times 10^6$ UFC/mL no período das águas, não havendo diferença ($p > 0,05$) entre os dois períodos avaliados. Ainda, neste estudo, não foram observadas diferenças entre períodos quando se avaliou a contagem de *Staphylococcus coagulase positivo* e bactérias ácido-láticas. Nas chuvas, a contagem média de *Staphylococcus coagulase positivo* foi de $< 1 \times 10^4$ UFC/mL e na seca de $7,3 \times 10^4$ UFC/mL. Em relação as bactérias ácido-láticas, no período da seca, as médias de contagens no meio ágar M17 e MRS, respectivamente, foram de $2,1 \times 10^7$ UFC/mL e $2,3 \times 10^5$ UFC/mL e, no período chuvoso, de $5,5 \times 10^7$ UFC/mL e $1,8 \times 10^7$ UFC/mL.

3.5. Qualidade microbiológica do leite cru

Entende-se por leite o produto oriundo da ordenha completa, ininterrupta, em condições de higiene, de vacas sadias, bem alimentadas e descansadas (Brasil, 1952). Para atender a essas exigências e, dessa forma, garantir a segurança do queijo elaborado a partir de leite cru, é indispensável que se realizem atividades de controle da qualidade do leite e da sanidade do animal. A legislação estadual reforça essa importância ao afirmar que a qualidade e a inocuidade do queijo artesanal e sua adequação para o consumo são asseguradas por meio da utilização em sua elaboração de leite proveniente de rebanho sadio, que não apresente sinais clínicos de doenças infecto-contagiosas e cujos testes oficiais de zoonoses, tais como brucelose e tuberculose, apresentem resultados negativos (Minas Gerais, 2012).

O Programa de Controle de Mastite, com a realização de exames para detecção de mastite clínica e subclínica, é obrigatório para as propriedades rurais que produzam o queijo Minas artesanal. Este programa inclui a realização de uma análise mensal do leite da propriedade em laboratório da Rede Brasileira da Qualidade do Leite (RBQL) para composição centesimal, contagem de células somáticas e contagem bacteriana total (Brasil, 2011). Esse controle, aliado às boas práticas de ordenha e ao manejo adequado dos animais e do ambiente, é indispensável para obtenção de uma matéria-prima desejável e segura para a produção do QMA (Winck *et al.*, 2010).

A tabela 4 indica os parâmetros microbiológicos para leite cru usado na elaboração de QMA (Minas Gerais, 2002b).

Tabela 4. Parâmetros microbiológicos estabelecidos para inspeção de leite cru destinado à produção de queijo Minas artesanal

Parâmetros microbiológicos	Critério de inspeção
Contagem Bacteriana Total (UFC/mL)	≤ 100.000
Contagem de Células Somáticas (Células/mL)	≤ 400.000
<i>Staphylococcus aureus</i> (UFC/mL)	≤ 100
<i>Escherichia coli</i> (UFC/mL)	≤ 100
Pesquisa de <i>Salmonella</i> spp./25mL	Ausência
<i>Streptococcus</i> β-hemolíticos (Lancefield A, B, C, G e L)/0,1mL	Ausência

Fonte: Minas Gerais, 2002b

O leite a ser utilizado na elaboração do queijo Minas artesanal (QMA) é desprovido de tratamento térmico. Alguns autores argumentam que o queijo, além de perder propriedades sensoriais durante a pasteurização, apresenta menores contagens de bactérias ácido-láticas, que são favoráveis à qualidade do produto (Grappin e Beuvier, 1997). Entretanto, se este queijo for feito a partir de leite cru com baixas contagens bacterianas e livre de patógenos e suas toxinas, ele não oferece risco aos consumidores, podendo ser dispensado o processo de pasteurização (Vargas *et al.* , 1998). De fato, o leite cru representa uma importante fonte de bactérias desejáveis para a produção de queijo artesanal (Feutry *et al.* , 2012). Por outro lado, também pode contaminar o queijo com micro-organismos patogênicos e ou deteriorantes, levando a problemas como estufamento precoce, falta de uniformidade do produto final e a presença de toxinas, o que pode trazer risco à saúde de quem o consome (González *et al.* , 2003; Law e Tamime, 2010). Na região de Campo das Vertentes, há uma escassez de pesquisas sobre a presença de micro-organismos desejáveis e indesejáveis no leite cru de queijarias artesanais, em especial de produtores não cadastrados no Serviço de Inspeção Estadual.

3.5.1. Contagem de Células Somáticas e Contagem Bacteriana Total

A saúde do úbere de vacas é uma preocupação dos produtores de leite porque determina diretamente a qualidade do leite produzido (Costa e Reinemann, 2002). A presença de bactérias patogênicas na glândula mamária resulta em resposta inflamatória, com o aumento da Contagem de Células Somáticas (CCS), que também pode ser influenciada pelo estado nutricional, estágio de lactação, idade, estresse, além do tipo de patógeno envolvido (Kitchen, 1981).

As células somáticas são constituídas principalmente pelos leucócitos e seu aumento no leite, indicando a presença de mastite, afetam negativamente sua composição, produtividade e qualidade de seus derivados. Os principais problemas relacionados ao uso deste leite na elaboração do queijo são o baixo rendimento, uma vez que alguns patógenos produzem lipases e proteases que degradam as proteínas e gordura do leite, e defeitos sensoriais, como sabores rançosos ou amargos no produto final (Hayes e Boor, 2001).

A Contagem Bacteriana Total (CBT) é a contagem do número de micro-organismos presentes em uma dada amostra de leite e, por isso, um importante indicador da qualidade do leite cru e, conseqüentemente, do queijo produzido a partir dele (Jayarao e Wolfgang, 2003). É influenciada pela saúde da glândula mamária, pela higiene de ordenha e do ambiente em que o animal é alojado, pelos procedimentos de limpeza do equipamento de ordenha, pela qualidade da água utilizada e pelos processos de conservação do leite, pós-ordenha (Santos e Fonseca, 2007). Altas contagens bacterianas no leite usado na elaboração do queijo além de exercer influência sobre as características sensoriais e tempo de prateleira do produto, ainda elevam a probabilidade de veiculação de doenças (Machado, 2008).

Oliveira (2014) encontrou valores de contagem de células somáticas e contagem bacteriana total acima daqueles permitidos pela legislação no leite cru usado na elaboração de queijo Minas artesanal de Campo das Vertentes, sem que houvesse diferença ($p > 0,05$) entre os períodos avaliados. As médias foram, respectivamente, de $3,9 \times 10^5$ CCS/mL, no período seco e $8,9 \times 10^5$ CCS/mL, no período chuvoso e de $7,7 \times 10^5$ UFC/mL, no período seco, e $4,3 \times 10^5$ UFC/mL no período chuvoso. De forma semelhante, não foi observada diferença ($p > 0,05$) na CBT média de leite cru utilizado na elaboração de queijo Serrano, que foi de $1,2 \times 10^6$ UFC/mL no verão e de 5×10^5 UFC/mL no inverno (Souza *et al.*, 2003).

Em propriedades rurais produtoras de queijo Minas artesanal, localizadas na região da Serra da Canastra (Minas Gerais) não houve diferença significativa entre as médias dos resultados da CBT e CCS das amostras de leite coletadas, considerando o nível de cadastramento das propriedades. As médias nas propriedades cadastradas foram $4,8 \times 10^5$ CCS/mL e $1,2 \times 10^6$ UFC/mL para CCS e CBT, respectivamente e $2,5 \times 10^5$ CCS/mL e $1,8 \times 10^5$ UFC/mL nas propriedades não cadastradas (Resende, 2010).

Leite cru usado na elaboração de queijo artesanal, em Vermont, Estados Unidos, apresentou contagem bacteriana total média de $4,9 \times 10^4$ UFC/mL. No mesmo estudo, a contagem de células somáticas foi de $2,2 \times 10^5$ CCS/mL (D'amico e Donnelly, 2010). Valores semelhantes foram encontrados em trabalho realizado no nordeste da Itália, em que leite cru usado da elaboração do queijo Montasio, um queijo artesanal de denominação de origem protegida, a contagem de células somáticas foi de $1,9 \times 10^5$ CCS/mL, enquanto que a de contagem bacteriana foi de $2,5 \times 10^4$ UFC/mL (Innocente e Biasutti, 2013).

Durante e após a ordenha, nas fases de estocagem e transporte até a queijaria, micro-organismos indesejáveis podem contaminar o leite através de fontes ambientais, manipuladores e dos próprios animais. Mastites também são importantes fontes de contaminação durante a produção, principalmente por *Staphylococcus aureus*. Por fim, a água e as fezes também podem contaminar todo o ambiente de ordenha e o leite com micro-organismos como *Salmonella* spp. e *Escherichia coli* (Mendes, 2006).

3.5.2. Coliformes totais e termotolerantes

As bactérias do grupo coliformes são consideradas micro-organismos indicadores no leite, pois, quando presentes, podem fornecer informações sobre a ocorrência de contaminação fecal, sobre a provável presença de patógenos ou a deterioração potencial do alimento, além de poder indicar condições sanitárias inadequadas durante o processamento, produção ou armazenamento (Franco e Landcraf, 2003).

Amostras de leite cru utilizado para a produção de QMA foram coletadas por Pereira *et al.* (2008) em fazendas na região da Serra de Canastra e avaliadas quanto a presença de coliformes. Das amostras de leite avaliadas, 25% apresentaram contagens elevadas para coliformes totais e termotolerantes em contagens de até $2,4 \times 10^3$ UFC/mL para ambos os parâmetros microbiológicos. Valores elevados, também, foram encontrados para contagem de coliformes a 30°C, com média de 764 NMP/mL no período seco e 1.100 NMP/mL no período chuvoso, na região Campo das Vertentes, não sendo as médias de contagens entre períodos diferentes ($p > 0,05$) (Oliveira, 2014).

Em pesquisa realizada em leite cru utilizado na elaboração do QMA do Serro, as contagens médias de coliformes totais foram de $8,1 \times 10^4$ UFC/mL nas águas e de $1,1 \times 10^4$ UFC/mL nas secas. Para *Escherichia coli*, as contagens foram de 6×10^1 UFC/mL nas águas e de $3,2 \times 10^1$ UFC/mL nas secas. Não houve diferença entre os períodos estudados ($p > 0,05$) (Martins, 2006). Resultados semelhantes foram observados em leite cru utilizado na elaboração de queijo Serrano, em que não houve diferença entre as estações avaliadas. No verão, foram encontradas contagens médias de $1,2 \times 10^4$ UFC/mL e $1,3 \times 10^3$ UFC/mL para coliformes totais e fecais, respectivamente. No inverno, as contagens médias de coliformes totais e fecais foram de $3,5 \times 10^3$ UFC/mL e $5,6 \times 10^1$ UFC/mL, respectivamente. (Souza *et al.*, 2003).

Em estudo realizado no leite cru usado na produção do queijo artesanal Corrientes, na Argentina, a contagem de coliformes totais foi de $2,3 \times 10^3$ UFC/mL e a de *Escherichia coli* de $1,7 \times 10^2$ UFC/mL (Vasek *et al.*, 2013). Em estudo com leite cru usado na elaboração de QMA de Araxá as contagens de coliformes a 30°C e *Escherichia coli* variaram de 0 a 5×10^3 UFC/mL e 0 a $3,2 \times 10^1$ UFC/mL, respectivamente (Araújo, 2004).

3.5.3. *Staphylococcus spp.*

Staphylococcus spp. constitui o mais comum agente etiológico da mastite bovina contagiosa causando redução na qualidade do leite e do queijo a partir dele produzido. Assim, como no caso dos coliformes a 30°C e a 45°C, não existem padrões para a contagem de *Staphylococcus spp.* no leite cru. Porém, a presença de um número elevado dessas bactérias indica perigo potencial para a saúde pública, principalmente devido à produção de enterotoxina estafilocócica, que é termorresistente (Guido *et al.*, 2010). Carmo *et al.* (2002) mostraram a produção de toxinas em contagens de *Staphylococcus spp.* de $2,4 \times 10^3$ UFC/mL no leite cru, o que ratifica o risco de intoxicação causado pela ingestão desse tipo de alimento e de seus derivados.

Staphylococcus aureus foram pesquisados em leite cru utilizado para elaboração do queijo Minas Artesanal do Serro, em diferentes estações do ano. Em todas as estações foi observada a contaminação por *Staphylococcus aureus* acima dos padrões microbiológicos exigidos pela legislação, sendo observadas maiores médias ($p < 0,05$) no outono ($5,1 \times 10^3$ UFC/mL) e menores médias na primavera ($8,7 \times 10^2$ UFC/mL) (Santos, 2010). Contagens altas de *Staphylococcus aureus* também foram verificadas em leite cru usado na elaboração de QMA de Araxá com mínimo de 10^1 UFC/mL e máximo de $3,6 \times 10^3$ UFC/mL (Araújo, 2004).

Em leite cru usado na elaboração de QMA do Serro, *Staphylococcus aureus* foi encontrado em altas contagens nos períodos seco e chuvoso, sem diferença ($p > 0,05$) entre os períodos avaliados. No período chuvoso, a contagem média encontrada foi de $2,8 \times 10^3$ UFC/mL e no seco de $2,7 \times 10^4$ UFC/mL (Martins, 2006). Em leite cru da região de Campo das Vertentes

Staphylococcus coagulase positivo não foi detectado em nenhum dos períodos (seca e chuvas) avaliados (Oliveira, 2014).

Borges *et al.* (2008) encontraram contagens de $3,3 \times 10^4$ UFC/mL a $1,5 \times 10^7$ UFC/mL de *Staphylococcus* spp. em leite cru usado na elaboração de queijo coalho e de $8,0 \times 10^3$ UFC/mL até $5,0 \times 10^6$ UFC/mL de *Staphylococcus* coagulase positivo. Neste mesmo trabalho, foi detectada a presença de enterotoxinas clássicas, A, B, C, D e E em 20% das amostras de leite cru analisadas.

A contagem de *Staphylococcus aureus* no leite cru utilizado na elaboração de queijo artesanal na Irlanda variou de <1 a 9×10^2 UFC/mL. Das 51 amostras de leite analisadas, 78% foram positivas para *Staphylococcus aureus*, embora a maioria das amostras tivesse baixa contagem, inferior a 2×10^2 UFC/mL (Hunt *et al.* , 2012). Ainda neste estudo, alguns isolados foram caracterizados como produtores de enterotoxina C. Resultados semelhantes foram encontrados em pesquisa de *Staphylococcus aureus* em queijo norueguês feito a partir de leite cru, em que as contagens variaram de 1,3 UFC/mL a 10^2 UFC/mL (Jakobsen *et al.* , 2011).

3.5.4. *Salmonella* spp.

Os bovinos leiteiros são susceptíveis à infecção por *Salmonella* spp. Este micro-organismo, que pode ser agente causador de mastite subclínica no rebanho, é comumente eliminado no leite e nas fezes dos animais infectados (Langoni *et al.* , 1991). Por este motivo, a obtenção higiênica do leite e o controle de mastite no rebanho são importantes medidas na prevenção da contaminação de *Salmonella* spp. no leite cru e, conseqüentemente, do queijo produzido a partir desta matéria-prima (Generoso e Langoni, 2011).

Em pesquisa em propriedades leiteiras na Pensilvânia, *Salmonella* spp. foi isolada em 6% das amostras de leite cru (Jayarao *et al.* , 2006). Em leite cru produzido nas microrregiões do triângulo mineiro, MG, a frequência de isolamento de bactérias do gênero *Salmonella* foi de 1,8% das amostras analisadas (Okura *et al.* , 2005). Por outro lado, em leite cru usado na elaboração de queijo Minas artesanal de propriedades cadastradas no IMA na região de Campo das Vertentes não houve o isolamento de *Salmonella* spp. nos períodos (chuva e seca) analisados (Oliveira, 2014). Da mesma forma, em leite cru usado na elaboração de queijo Coalho não foi detectada *Salmonella* spp. (Freitas *et al.* , 2013).

3.5.5. Bactérias ácido-láticas

A microbiota predominante no leite cru geralmente inclui gêneros de bactérias ácido-láticas, como *Lactococcus* spp., *Lactobacillus* spp., *Leuconostoc* spp., *Enterococcus* spp. e *Streptococcus* spp. (Tebaldi *et al.* , 2008; Melo *et al.* , 2010). A presença destas bactérias em leite cru é desejada, uma vez que elevam diretamente a contagem de BAL no queijo Minas artesanal.

Bactérias ácido-láticas foram encontradas em concentrações de 10^3 a 10^4 UFC/mL em 44,4% das amostras de leite cru usado na elaboração de queijo artesanal da região de Viçosa, MG (Ortali, 2009). Resultado semelhante foi encontrado no leite cru usado na elaboração do queijo Minas artesanal da Serra do Salitre, que apresentou contagem média de $4,3 \times 10^2$ UFC/mL (Lima *et al.* , 2009).

A contagem de bactérias ácido-láticas em leite cru usado na elaboração de queijo Minas artesanal, de propriedades não cadastradas localizadas na região da Serra da Canastra foi de $2,1 \times 10^6$ UFC/mL no ágar MRS, e $1,4 \times 10^6$ UFC/mL no M17. *Enterococcus* foi o gênero de BAL mais frequentemente isolado nestas amostras (Resende *et al.* , 2011). De forma semelhante, a maioria das cepas bacterianas do leite de vaca cru usado na elaboração de queijo coalho regional foi caracterizada como *Enterococcus faecium*, além da presença confirmada de *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* e *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris* (Cavalcante *et al.* , 2007).

Em pesquisa de leite cru usado na elaboração do queijo Zlatar, um queijo artesanal da Eslováquia, contagem de bactérias ácido-láticas apresentou valores de $3,2 \times 10^5$ UFC/mL, no meio MRS, e 7×10^5 UFC/mL, no meio M17 (Veljovic *et al.* , 2007).

As contagens de bactérias ácido-láticas em leite cru usado na elaboração do queijo artesanal Castelmagno PDO, da região do Vale de Grana, noroeste da Itália, variaram de $3,2 \times 10^6$ UFC/mL a $6,3 \times 10^6$ UFC/mL, sendo *Lactococcus* spp., *Lactobacillus* spp. e *Streptococcus* spp. os gêneros mais prevalentes (Dolci *et al.* , 2010).

Enterococcus faecium, *Lactobacillus brevis*, *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* e subsp. *lactis*, *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus plantarum*, *Leuconostoc lactis*, *Enterococcus durans*, *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus hirae* e *Lactobacillus paracasei* foram isolados de leite cru usado na elaboração de queijo Ossau-Iraty, um queijo artesanal produzido no sudoeste da França. A contagem média de *Enterococcus* spp. foi $3,3 \times 10^3$ UFC/mL, sendo a maior contagem encontrada. Por outro lado, *Lactobacillus* spp. apresentou a menor contagem, variando de 10^1 UFC/mL a $7,9 \times 10^1$ UFC/mL (Feutry *et al.* , 2012).

3.5.6. Bolores e leveduras

Bolores e leveduras, mesmo que em quantidades mínimas, são, frequentemente, encontrados em leite. Uma vez presentes no leite podem contaminar o queijo, ocasionando tanto a deterioração do produto quanto a possível produção de micotoxinas, compostos lesivos ao homem. Falhas nas condições higiênico-sanitárias da obtenção do leite e nos procedimentos de conservação contribuem para a elevação de suas contagens no alimento (Melville *et al.* , 2006). Em pesquisa de leite cru usado na elaboração do queijo artesanal Sardo, na Sardenha, Itália, a contagem de bolores e leveduras foi de $4,4 \times 10^2 \pm 10^1$ UFC/mL (Fadda *et al.* , 2004).

Leite cru usado na elaboração do queijo da Serra do Salitre apresentou contagens médias de bolores e leveduras de $1,1 \times 10^2$ UFC/mL (Lima *et al.* , 2009). Resultados semelhantes foram encontrados na pesquisa de leite cru usado na produção do queijo Minas artesanal da Serra da Canastra em que foram encontrados valores entre 10^2 UFC/mL e 4×10^2 UFC/mL (Boreli *et al.* , 2006b).

Leite cru utilizado na elaboração de queijo Serrano apresentou, no verão, contagens médias de $7,9 \times 10^2$ UFC/mL e $1,1 \times 10^3$ UFC/mL para bolores e leveduras, respectivamente, e no inverno estas contagens foram de $2,4 \times 10^1$ UFC/mL e $2,3 \times 10^3$ UFC/mL. Não houve diferença ($p > 0,05$) entre as estações (Souza *et al.* , 2003). De forma oposta, em trabalho realizado em queijarias da região de Campo das Vertentes, não houve a detecção de bolores e leveduras no leite cru usado na elaboração do QMA, no período seco e chuvoso (Oliveira, 2014).

3.6. Qualidade físico-química do leite cru

Sob o ponto de vista químico, a composição média do leite é de 87,4% de água e 12,6% de sólidos totais, sendo 3,9% de gordura, 3,2% de proteína, 4,6% de lactose e 0,90% de minerais (Harding, 1995). A composição do leite, principalmente de gordura e proteína, pode variar devido a vários fatores como a sazonalidade, a genética, a nutrição e a idade do animal.

A tabela 5 indica os parâmetros físico-químicos determinados para leite cru destinados à produção de queijo Minas artesanal (Minas Gerais, 2002b).

Tabela 5. Parâmetros físico-químicos estabelecidos para inspeção de leite cru destinado à produção de queijo Minas artesanal

Parâmetros físico-químicos	Critério de inspeção
Teor de gordura (%)	≥ 3
Lactose (%)	≥ 4,3
Extrato seco desengordurado (ESD) (%)	≥ 8,5
Sólidos totais (%)	≥ 11,5

Fonte: Minas Gerais, 2002b

Em leite cru usado na elaboração de queijos artesanais em Montes Claros foram encontrados, em média, 4,1% de gordura, 3,5% de proteína, 4,7% de lactose e 13,2% de sólidos totais (Almeida *et al.*, 2012). Em pesquisa de leite cru para a produção de queijo da Serra da Canastra os valores médios de gordura, proteína, lactose e extrato seco total relatados foram de 3,51%, 3,15%, 4,54% e 12,22%, respectivamente (Ornelas, 2005). De forma semelhante, em trabalho realizado no nordeste da Itália, leite cru usado da elaboração do queijo Montasio apresentou valores de 4,98% de lactose, 3,82% de gordura e 3,28% de proteína (Innocente e Biasutti, 2013).

Em leite utilizado para a produção de queijo Saint-Nectaire, francês, os teores médios de gordura e proteína foram, respectivamente, 3,7% e 3,19% no verão, e 4,37% e 3,32% no inverno, havendo diferença significativa nas porcentagens de gordura e proteína quando comparados os períodos de produção (Leriche e Fayolle, 2012). O mesmo não foi observado em estudo realizado em queijarias cadastradas na região de Campo das Vertentes. As amostras de leite cru analisadas apresentaram médias de gordura (4,31%) e proteína (3,38%), no período seco, semelhantes ($p > 0,05$) as médias de gordura (4,66%) e proteína (3,66%) obtidas no período chuvoso (Oliveira, 2014).

A busca pela qualidade do leite cru requer, além da melhoria dos parâmetros microbiológicos, controle sob o aspecto químico, visando os resíduos de antimicrobianos, micotoxinas, pesticidas e metais pesados e aspectos físicos, representados por materiais estranhos que possam vir a causar algum dano a saúde do consumidor (Dores, 2007). Nesse sentido, um dos poucos trabalhos realizados em queijarias artesanais revelou a presença de aflatoxina B1 em amostras de leite cru e QMA. Os autores apontaram o consumo de rações contaminadas com essa aflatoxina como a causa para a presença do seu resíduo no leite e conseqüentemente, no queijo (Prado *et al.*, 2000).

3.7. Qualidade microbiológica de queijos artesanais

A segurança microbiológica visa a ampla distribuição de alimentos livres de micro-organismos que possam disseminar doenças transmitidas por alimentos (DTA), com o objetivo de garantir a saúde da população (Ortega e Borges, 2012).

Os derivados de leite, e principalmente os queijos, são alimentos altamente nutritivos, ideais para o crescimento de micro-organismos patogênicos como também para os deteriorantes (Dores, 2007). *Salmonella* spp., *Escherichia coli*, *Campylobacter* spp., *Listeria* spp., *Bacillus cereus*, *Brucella* spp. e *Staphylococcus aureus* são alguns exemplos de micro-organismos patogênicos associados a surtos de infecções e intoxicações alimentares nos quais produtos lácteos, em especial, os queijos, estão frequentemente envolvidos (Jay, 2005).

Algumas etapas da produção do QMA, como a prensagem manual, o processo de salga, viragem e lavagem do queijo o caracterizam como um produto altamente manipulado e, por este motivo, passível de contaminação, especialmente de origem microbiológica (Pinto *et al.* , 2009). Entretanto, esse produto apenas representa um risco em potencial à saúde pública se não forem seguidos, com rigor, cuidados higiênicos sanitários no manejo dos animais e higiênicos no ambiente e equipamentos de ordenha e na produção e comercialização desse queijo (Volkman *et al.* , 2002).

Há um conjunto de características do QMA e do seu processo de elaboração, que desempenham papéis de destaque no controle da microbiota indesejável, sendo assim, importantes para a segurança de consumo desses queijos. Entre essas características destacam-se: a qualidade da matéria-prima, a temperatura e tempo de maturação, a aplicação das Boas Práticas de Fabricação (BPF), a presença de uma microbiota endógena rica em bactérias lácticas e a adição de cloreto de sódio durante o processo de elaboração (Pinto *et al.* , 2009; Dores e Ferreira, 2012).

O grande desafio na produção de queijos Minas artesanais, hoje, é o controle de possíveis patógenos no produto, como *Staphylococcus aureus*, *Listeria* spp., *Salmonella* spp., *Brucella* spp., *Mycobacterium* spp., esporos de *Clostridium* spp. e outros. Tais micro-organismos, além de competidores com a microbiota normal, são causadores de doenças em humanos (Bertoni *et al.* , 2001; Fernandes, 2009). Ao mesmo tempo, a microbiota nativa formada principalmente por bactérias lácticas presentes no ambiente, no leite e no pingo, conferem, além das características sensoriais ao produto final, esta proteção microbiológica esperada no queijo Minas artesanal (Lima *et al.* , 2009).

As análises requeridas por legislação estadual vigente para micro-organismos não desejáveis são: contagem de coliformes totais e termotolerantes, *Staphylococcus* coagulase positivo, pesquisa de *Salmonella* spp. e de *Listeria* spp., que estão apresentadas na tabela 6 (Brasil, 1996; Minas Gerais, 2008). Trabalhos científicos avaliando queijos Minas artesanais têm demonstrado a presença frequente destes micro-organismos no produto final (Araújo, 2004; Nóbrega, 2007; Pereira *et al.* , 2008).

Tabela 6. Parâmetros microbiológicos estabelecidos para inspeção de queijo Minas artesanal, segundo legislação estadual e federal vigentes.

	Critério de inspeção	
	Estadual (Decreto 44.864/2008)	Federal † (Portaria 146/1996)
Parâmetros microbiológicos*		
Pesquisa de coliformes 30°C (UFC/g)	n = 5; c = 2; m = 1.000; M = 5.000	
Pesquisa de coliformes 45°C (UFC/g)	n = 5; c = 2; m = 100; M = 500	
Contagem de <i>Staphylococcus</i> coagulase positivo (UFC/g)	n = 5; c = 2; m = 100; M = 1.000	
Pesquisa de <i>Salmonella</i> spp./25g	n = 5; c = 0; m = 0	
Pesquisa de <i>Listeria</i> spp./25g	n = 5; c = 0; m = 0	

* Plano de amostragem (n; c; m; M), segundo Brasil, 2001. Para amostra indicativa, limite máximo é o valor representado por M

† Parâmetros microbiológicos para queijos industrializados de média umidade (36% a 45,9%)

Fontes: Brasil, 1996; Minas Gerais, 2008

3.7.1. Coliformes totais e termotolerantes

Os coliformes totais são bactérias da família *Enterobacteriaceae* capazes de fermentar a lactose com produção de gás e ácido lático quando incubados a 35-37°C, por 24 a 48 horas. São bastonetes Gram-negativo, não formadores de esporos, aeróbios ou anaeróbios facultativos (Franco e Landgraf, 2003). O grupo de coliformes totais, também conhecidos como coliformes a 30°C, é composto por cerca de 20 espécies, dentre os quais se encontram os gêneros *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Escherichia* e *Klebsiella* (Jay *et al.* , 2005).

Coliformes termotolerantes, fecais ou coliformes a 45°C são bactérias pertencentes ao grupo dos coliformes totais que fermentam a lactose quando incubadas a temperaturas de 44-45°C, por 24 a 48 horas, tendo como principal espécie representante, *Escherichia coli* (Franco e Landgraf, 2003).

Por colonizarem o trato intestinal de animais de sangue quente, incluindo os humanos, bactérias do grupo coliforme têm sido empregadas como indicadores de qualidade higiênica (Loguercio e Aleixo, 2001). A presença de coliformes no queijo indica, portanto, falhas na obtenção higiênica do leite, nos procedimentos de limpeza dos equipamentos de ordenha e utensílios e no processamento, manipulação e estocagem do produto.

Trinta e duas amostras (80%) apresentaram coliformes a 35°C acima do permitido na legislação em queijo Minas artesanal do Serro. Neste mesmo estudo, vinte e quatro amostras (60%) apresentaram coliformes a 45°C acima de 5×10^3 UFC/g (Brant *et al.* , 2007). Altas contagens também foram vistas em queijos coloniais, com e sem inspeção, da microrregião de Francisco Beltrão- PR, no qual foram encontradas contagens entre <3 a >11.000 NMP/g para coliformes totais e termotolerantes (Silva e Silva, 2013).

Em QMA da Canastra, maturado à temperatura ambiente por oito dias, as contagens de coliformes totais foram de $5,6 \times 10^3$ UFC/g nas águas e de $6,0 \times 10^3$ UFC/g, nas secas. Para

Escherichia coli, as contagens foram de $2,2 \times 10^3$ UFC/g e $2,0 \times 10^3$ UFC/g nas águas e secas, respectivamente. Não houve diferença entre os períodos avaliados (Dores, 2007). De forma semelhante, QMA maturado do Serro, também, por 8 dias, à temperatura ambiente, apresentou contagem de coliformes a 30°C de $1,7 \times 10^3$ UFC/g, nas águas, igual, estatisticamente, a de $2,9 \times 10^3$ UFC/g, na secas. O mesmo não foi observado para contagem *Escherichia coli*, neste mesmo trabalho, em que a contagem de $3,2 \times 10^2$ UFC/g, nas águas, foi superior a de $9,3 \times 10^1$ UFC/g, na secas (Martins, 2006).

Em queijos artesanais comercializados em feiras livres de Uberlândia/MG as contagens de coliformes totais variaram de 5×10^1 NMP/g a $1,6 \times 10^5$ NMP/g, enquanto que as de coliformes termotolerantes ficaram entre 2×10^1 NMP/g a $1,6 \times 10^4$ NMP/g (Rezende *et al.*, 2010). Resultados semelhantes foram encontrados em queijos artesanais Corrientes que apresentaram contagem média de $4,3 \times 10^5$ UFC/g para coliformes a 30°C e $2,5 \times 10^4$ UFC/g para *Escherichia coli* (Vasek *et al.*, 2013).

As médias dos NMP de coliformes a 30°C e coliformes a 45°C encontradas em QMA produzidos em queijarias não cadastradas na região da Serra da Canastra foram maiores ($p > 0,05$) que as médias dos NMP desses micro-organismos em queijarias cadastradas. Nas propriedades cadastradas, as médias foram de 627 NMP/mL e 136 NMP/mL para coliformes a 30°C e coliformes a 45°C , respectivamente, enquanto que nas propriedades não cadastradas foram de 1202 NMP/mL e 1104 NMP/mL (Resende, 2010).

Em QMA de Araxá, as contagens de coliformes a 30°C e *Escherichia coli* variaram de 0 UFC/g a $3,2 \times 10^6$ UFC/g, com média de $1,5 \times 10^4$ UFC/g, e de 0 UFC/g a $1,7 \times 10^6$ UFC/g, com média de 10^3 UFC/g, respectivamente (Araújo, 2004). Valores inferiores de contagens foram encontrados em queijo do Serro, em que coliformes a 30°C apresentaram contagens médias de $4,4 \times 10^3$ UFC/g e *Escherichia coli* de $1,7 \times 10^2$ UFC/g (Santos, 2010).

As contagens de coliformes totais e fecais em queijo Serrano, no verão, de $5,8 \times 10^5$ UFC/g e de $3,9 \times 10^5$ UFC/g, respectivamente, foram superiores as contagens encontradas no inverno de $9,5 \times 10^4$ UFC/g e de $8,3 \times 10^3$ UFC/g, aos 7 dias de maturação (Souza *et al.*, 2003). Tendência semelhante foi relatada em trabalho realizado em QMA de Campo das Vertentes em que as contagens médias de coliformes a 30°C e a 45°C , na época das chuvas, de 6407 NMP/g e 5545 NMP/g, respectivamente, foram superiores as contagens encontradas na seca, de 889 NMP/mL e 513 NMP/mL (Oliveira, 2014).

Com relação aos níveis de contaminação por coliformes totais em 127 amostras de queijo coalho analisados, 56 (44,1%) não apresentaram crescimento deste micro-organismo, 15 (11,8%) apresentaram contagem entre 10^1 UFC/g e 5×10^2 UFC/g e 56 (44,1%) tinham mais de 5×10^2 UFC/g. Destas amostras analisadas, 44,1% ainda se encontravam acima do limite aceitável de $5,0 \times 10^2$ UFC/g de coliformes termotolerantes (Duarte *et al.*, 2005).

Em estudo realizado em queijo artesanal Feta, grego, as contagens de coliformes totais variaram de 1,5 UFC/g a $1,8 \times 10^5$ UFC/g, ao longo de 60 dias de maturação. Já as contagens de *Escherichia coli* variaram de 4,2 UFC/g a 8×10^4 UFC/g (Manolopoulou *et al.*, 2003). Valores altos também foram reportados por Alegría *et al.* (2009) ao analisarem queijos Casín, no qual as contagens médias de coliformes variaram de $3,5 \times 10^5$ UFC/g a $2,9 \times 10^6$ UFC/g, em queijos maturados por 30 dias. Por outro lado, de 108 amostras de queijos Serrano analisadas, 37 (34,26%) e 39 (36,11%) apresentaram contagens acima de 10^3 UFC/g para coliformes totais e

Escherichia coli, respectivamente, sendo que houve uma diminuição significativa na população de *E. coli* após 30 dias de maturação (Melo *et al.* , 2013).

3.7.2. *Staphylococcus spp.*

Staphylococcus spp. pertencem à família *Micrococcaceae*, são cocos Gram e catalase positivo, imóveis, não-esporulados e, geralmente, não-encapsulados (Jay *et al.* , 2005). A presença de *Staphylococcus* spp. no QMA pode estar associada a condições precárias de higiene durante a elaboração do produto, utilização de temperaturas impróprias para a sua conservação, período de maturação inadequado do queijo, bem como a presença de vacas com mastite no rebanho, determinando uma má qualidade da matéria prima. Estima-se que cerca de 30 a 50% da população humana seja portadora assintomática de *Staphylococcus* spp., sendo as fossas nasais, a cavidade oral, pele e pêlo, os locais de predileção do micro-organismo no homem. Por esta razão, a manipulação inadequada do QMA é uma importante fonte de contaminação do produto final (Stamford *et al.* , 2006).

Bactérias do gênero *Staphylococcus* estão entre os patógenos mais relacionados a surtos de intoxicação alimentar, sendo o leite e os derivados lácteos, principalmente os queijos, os alimentos mais associados a ocorrência de casos de intoxicação alimentar estafilocócica (Borges *et al.* , 2008).

A intoxicação alimentar estafilocócica se manifesta no homem na forma de gastroenterite aguda, com náusea, vômitos e diarreia. É resultante da ingestão de toxinas produzidas e liberadas por algumas cepas de *Staphylococcus* spp. quando presentes em populações elevadas (10^5 - 10^6 UFC/mL ou UFC/g) e sob condições adequadas (temperatura, pH, atividade de água e O_2), durante o seu desenvolvimento e a multiplicação no alimento contaminado. Estas toxinas são resistentes a ação de enzimas gástricas e jejunais, mantendo sua atividade no trato digestivo após ingestão, além de serem estáveis ao aquecimento (Le Loir *et al.*, 2003).

Staphylococcus spp. são tradicionalmente agrupados em duas categorias, de acordo com a capacidade de coagular o plasma, um importante fator de virulência do micro-organismo: coagulase positivo e coagulase negativo (Trabulsi e Alterthum, 2005). Entre as espécies coagulase positivo, *Staphylococcus aureus* é a mais frequentemente associada a casos e surtos de intoxicação alimentar em queijos (Borges *et al.* , 2008). Embora a legislação determine apenas a pesquisa de *Staphylococcus* coagulase positivo, já foram relatados alguns surtos de intoxicação estafilocócica associados as espécies coagulase negativo (Carmo *et al.* , 2002).

Trinta e três amostras (82,5%) de queijos Minas artesanais da região do Serro apresentaram contagens de *Staphylococcus* coagulase positivo acima de 10^3 UFC/g, estando impróprias ao consumo humano. Este micro-organismo foi o contaminante mais frequente, com contagem média de $1,2 \times 10^6$ UFC/g, sendo que 21 amostras (53%) apresentaram contagens acima de 10^5 UFC/g. Neste caso, o risco de produção de enterotoxinas é existente (Nicolau *et al.* , 2001). Ainda neste estudo, o queijo recém elaborado apresentou contagem média de $2,5 \times 10^5$ UFC/g. Com a maturação por 30 dias do queijo, houve redução ($p < 0,01$) desta contagem para cerca de $1,3 \times 10^4$ UFC/g (Brant *et al.* , 2007). Os resultados deste experimento são similares aos relatados por Lubeck *et al.* (2001) que verificaram 100% das amostras de queijos coloniais da região do Paraná contaminadas com elevadas contagens de *Staphylococcus aureus*, sendo a contagem média encontrada de $5,9 \times 10^5$ UFC/g.

A contagem média de *Staphylococcus* spp. em QMA da Serra da Canastra, maturado à temperatura ambiente, foi de $1,9 \times 10^4$ UFC/g, na chuva, e de $3,2 \times 10^3$ UFC/g, na seca, sendo as médias iguais ($p < 0,05$) (Dores *et al.* , 2013). O oposto foi descrito em QMA de Campo das Vertentes que apresentou contagens médias de *Staphylococcus* coagulase positivo de $1,1 \times 10^5$ UFC/g, na chuva superior ($p < 0,05$) a contagem de $2,6 \times 10^4$ UFC/g encontrada na seca. Da mesma forma, contagem de *Staphylococcus aureus* em QMA do Serro, aos 8 dias de maturação, de $2,5 \times 10^3$ UFC/g nas águas foi superior a contagem encontrada de $1,1 \times 10^2$ UFC/g na seca (Martins, 2006).

Em trabalho realizado em queijo Minas artesanal elaborado na região da Serra da Canastra, não houve diferença ($p > 0,05$) entre as médias dos resultados da contagem de *Staphylococcus* spp., considerando o nível de cadastramento das propriedades. A média nas propriedades cadastradas foi $1,2 \times 10^8$ UFC/g, e nas propriedades não cadastradas $2,1 \times 10^8$ UFC/g (Resende, 2010). Contagens semelhantes foram descritas em trabalho realizado em queijo Serra da Estrela, em que as contagens médias de *Staphylococcus* spp. variaram de $9,8 \times 10^6$ UFC/g a 5×10^7 UFC/g, ao longo de 180 dias de maturação, quando o leite usado na produção não havia sido refrigerado (Dahl *et al.* , 2000).

Trinta e seis das 108 (33,33%) amostras analisadas de queijo Serrano exibiram contagens de *Staphylococcus aureus* acima de 10^3 UFC/g, valor estabelecido como máximo pela legislação vigente para *Staphylococcus* coagulase positivo. Foi observada uma diminuição na contagem deste micro-organismo dos 15 aos 45 dias e, após este período, houve um aumento na sua população (Melo *et al.* , 2013).

Staphylococcus aureus foi encontrado em contagens médias de $1,1 \times 10^3$ UFC/g em QMA do Serro (Santos, 2010). Contagens superiores deste micro-organismo foram relatadas em QMA de Araxá, em que os valores se encontraram dentro da faixa de 0 UFC/g a $9,3 \times 10^7$ UFC/g, com média de $6,2 \times 10^4$ UFC/g (Araújo, 2004).

Staphylococcus coagulase positivo foi observado em 72,7% das amostras de queijo de coalho e 84,7% das amostras de queijo de manteiga, com contagens variando de $7,0 \times 10^4$ UFC/g a $1,3 \times 10^8$ UFC/g e $2,4 \times 10^2$ UFC/g a $8,6 \times 10^6$ UFC/g, respectivamente, no Rio Grande do Norte (Feitosa *et al.* , 2003). Contagens inferiores foram descritas por Borges *et al.* (2008) ao avaliarem uma linha de produção de queijo coalho. Neste estudo, *Staphylococcus* spp. apresentou contagens de $< 10^1$ UFC/g até $2,6 \times 10^3$ UFC/g e *Staphylococcus* coagulase positivo de $< 10^1$ UFC/g a $2,0 \times 10^2$ UFC/g. Baixas contagens de *Staphylococcus* coagulase positivo também foram encontradas em pesquisa realizada em queijos coloniais com e sem inspeção, da microrregião de Francisco Beltrão-PR, no qual todas as amostras apresentaram valor inferior a 1×10^1 UFC/g (Silva e Silva, 2013).

3.7.3. *Salmonella* spp.

O gênero *Salmonella* pertence a família *Enterobacteriaceae*, sendo um bastonete Gram negativo, não esporulado, anaeróbio facultativo e geralmente móvel, com presença de flagelos. É um dos principais agentes responsáveis por casos de toxinfecções alimentares, associada ao consumo de queijos.

Normalmente, encontrada no trato intestinal de animais domésticos e selvagens, especialmente aves e répteis, *Salmonella* spp. tem como principais veículos de disseminação alimentos e a

água (Jay *et al.* , 2005). A contaminação do queijo por *Salmonella* spp. pode ocorrer devido ao controle inadequado de temperatura, manipulação incorreta ou contaminação cruzada (Forsythe, 2002). Estudos em queijos contaminados por *Salmonella* spp. demonstram a capacidade destas bactérias de se manterem viáveis por longo período de tempo (Borges *et al.* , 1990; Modi *et al.* , 2001), o que ressalta a importância do controle de qualidade microbiológica do produto, visto que a legislação brasileira estabelece ausência desta bactéria em alimentos.

Em estudo com queijo maturado, sob refrigeração, do Serro, uma de oito amostras, no período das águas, apresentou *Salmonella* spp. aos 8 e 15 dias de maturação. Aos 22 dias, *Salmonella* spp. não foi mais isolada (Martins, 2006). De forma semelhante, *Salmonella* sp. foi verificada em uma das 20 amostras de queijos Minas frescos comercializado na cidade de Uberlândia – MG (Grandi e Rossi, 2006).

Sousa *et al.* . (2006) encontraram 30% das amostras positivas para *Salmonella* spp. em queijos Minas meia cura informais vendidos na cidade de Jacaré-SP. Em trabalho semelhante, no mesmo tipo de queijo, não foi encontrada *Salmonella* spp. em 161 amostras analisadas na cidade de São Paulo (Pedrosa, 2010).

Salmonella spp. foi detectada em 9% das amostras de queijo de coalho e em 15% das de queijo de manteiga produzidos no estado do Rio Grande do Norte (Feitosa *et al.* , 2003). Em estudo realizado em queijos de coalho, produzidos e comercializados no estado de Pernambuco, 5,5% das 127 amostras analisadas foram positivas para *Salmonella* spp. (Duarte *et al.* , 2005).

Nenhuma amostra de queijo apresentou contaminação por *Salmonella* spp. em análise de QMA do Serro (Brant *et al.* , 2007), QMA de Araxá (Araújo, 2004), QMA de Campo das Vertentes (Oliveira, 2014) e QMA comercializado em feiras livres (Rezende *et al.* , 2010). Da mesma forma, não foi detectada *Salmonella* spp. em queijos artesanais comercializados nos EUA (Brooks *et al.* , 2012), em queijos coloniais com e sem inspeção, da microrregião de Francisco Beltrão- PR (Silva e Silva, 2013) e em queijo Serrano (Melo *et al.* , 2013).

3.7.4. Bactérias ácido-láticas

O grupo das BAL compreende os gêneros de bactérias Gram positivo que são classificadas morfológicamente como bastonetes ou cocos não esporulados. Esses micro-organismos podem ser aeróbios, microaerófilos ou anaeróbios facultativos e utilizam preferencialmente a lactose como fonte de carbono. A fermentação pode ser do tipo homofermentativa, quando há produção de intensa quantidade de ácido lático, ou heterofermentativa, quando outras substâncias, além do ácido lático, como o ácido acético, dióxido de carbono e etanol, são também produzidas durante a fermentação da lactose (Poffo e Silva, 2011).

O grupo das BAL compreende bactérias Gram positivo dos gêneros *Aerococcus*, *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus* e *Weissella* (Zhang e Cai, 2014). As bactérias ácido-láticas estão amplamente distribuídas na natureza, particularmente no leite e no caso do QMA, no soro-fermento. Elas são também habitantes dos tratos digestivo, respiratório superior e urogenital inferior dos animais (Hove *et al.*, 1999).

As BAL constituem importante exemplo de micro-organismos desejáveis presentes nos QMA, pois desempenham um papel importante na inocuidade alimentar desse produto, além de

contribuir para seu sabor característico. Ao fermentar a lactose presente no queijo, produzem ácidos orgânicos, evitando assim que esse carboidrato seja utilizado como substrato para fermentações indesejáveis (Bruno e Carvalho, 2009). Esta fermentação reduz o pH do meio, inibindo o crescimento de certos micro-organismos patogênicos. Além do efeito desejável de acidificação, as BAL produzem substâncias antagonistas aos micro-organismos indesejáveis, entre elas as bacteriocinas (Riley e Wertz, 2002).

As bacteriocinas são peptídeos ou proteínas sintetizados no ribossomo e liberados no meio extracelular que apresentam ação bactericida ou bacteriostática sobre bactérias Gram positivo, dentre elas importantes patógenos de veiculação alimentar, como *Listeria monocytogenes*, *Clostridium botulinum*, *Bacillus cereus* e *Staphylococcus aureus* (Alexandre *et al.* , 2002; Guedes Neto *et al.* , 2005; Martins *et al.* , 2006).

Costa (2010) e Andrade (2012) avaliaram a atividade antagonista *in vitro* de bactérias ácido-láticas isoladas de queijo Minas artesanal da Serra da Canastra frente a bactérias de referência, entre elas *Staphylococcus aureus*, *Salmonella* spp., *Listeria monocytogenes* e *Escherichia coli*, e verificaram elevada capacidade de inibição principalmente pelos microrganismos do gênero *Lactobacillus*. Mais recentemente, foi atribuída às bactérias ácido-láticas a capacidade de minimizar o potencial toxigênico de *Staphylococcus* spp. quando presentes em uma mesma microbiota (Seridan *et al.* , 2012). Além de controlar o crescimento de microbiota indesejável, as BAL podem ainda exercer efeitos benéficos à saúde do hospedeiro. Ainda que, muitas vezes seja preciso testá-las *in vivo*, tais micro-organismos apresentam potencial probiótico (Pisano *et al.* , 2008; Andrade, 2012; Acurcio, *et al.* , 2014;).

A identificação das BAL isoladas a partir de alimentos pode ser realizada por métodos que envolvem o cultivo do micro-organismo, métodos fenotípicos-bioquímicos e, por fim, métodos moleculares. A identificação de espécies de bactérias ácido-láticas usando apenas os primeiros dois métodos citados apresenta limitações, sobretudo em relação à sensibilidade do método, no qual, muitas vezes não permite a distinção clara entre espécies ou cepas. Os métodos moleculares, por sua vez, apresentam como características a reprodutibilidade, automação e rapidez, sendo, muitas vezes, independentes de cultivo (Kalliopi *et al.* , 2004).

Diversos métodos moleculares têm sido desenvolvidos como alternativa segura para identificação e classificação das bactérias ácido-láticas em queijos Minas artesanais. Em sua grande maioria, baseiam na amplificação de genes específicos pela reação de polimerização em cadeia (*Polymerase Chain Reaction* - PCR) (Randazzo *et al.* , 2009).

A identificação de BAL envolvidas na produção e maturação de queijos artesanais tem sido objeto de estudo em várias regiões do mundo (Ouadghiri *et al.* , 2005; Dolci *et al.* , 2008). No QMA, as BAL predominantes foram as pertencentes aos gêneros *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Lactobacillus* e *Enterococcus* (Leite, 1993; Borelli *et al.* , 2006a; Nóbrega, 2007; Resende *et al.* , 2011).

Em queijo artesanal produzido na região da Serra do Salitre, Minas Gerais, a contagem média de BAL foi de $1,4 \times 10^6$ UFC/g, sendo as espécies de bactérias lácticas mais frequentes: *Lactococcus lactis*, *Enterococcus faecalis* e *Streptococcus agalactiae*, sendo esta última espécie comumente associada a mastite nas vacas. Apenas as populações de *Enterococcus* spp., *Enterococcus faecalis* e *Leuconostoc mesenteroides* apresentaram aumento significativo durante a maturação do queijo (Lima *et al.* , 2009). Contagens altas foram também relatadas em

pesquisa de BAL em QMA do Serro maturado por uma semana, à temperatura ambiente, em que a média encontrada foi de $7,9 \times 10^7$ UFC/g (Santos, 2010).

A contagem de bactérias ácido-láticas em queijo Minas artesanal de propriedades não cadastradas localizadas na região da Serra da Canastra foi de $3,0 \times 10^7$ UFC/g no meio MRS, e de 10^8 UFC/g no meio M17. *Lactobacillus* foi o gênero de BAL mais frequentemente isolado, sendo *Lactobacillus rhamnosus* a espécie mais frequente dentro deste gênero, seguido por *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus hilgardii* e *Lactobacillus paraplantarum* (Resende *et al.* , 2011).

Em estudo realizado com QMA de Campo das Vertentes as contagens médias de BAL no período seco de $8,3 \times 10^9$ UFC/g no meio MRS e de $9,5 \times 10^8$ UFC/g no meio M17 foram superiores as contagens encontradas no período chuvoso de $1,6 \times 10^8$ UFC/g e $1,7 \times 10^8$ UFC/g, nos meios MRS e M17, respectivamente (Oliveira, 2014).

No queijo português Serra Estrela, Dahl *et al.* (2000) observaram que as bactérias lácticas foram dominantes durante todo o período de maturação, variando de 10^7 UFC/g a 10^9 UFC/g. Neste trabalho, os principais gêneros encontrados foram: *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc* e *Enterococcus*. Resultados semelhantes foram encontrados por Borelli (2002), que encontrou alta contagem populacional de bactérias lácticas, entre 10^8 e 10^9 UFC/g no queijo da Serra da Canastra.

Estepar *et al.* (1999), ao avaliarem a microbiota láctica do queijo artesanal Peñamellera feito a partir de leite cru, no norte da Espanha, verificaram a predominância dos gêneros *Lactococcus* e *Leuconostoc* em contagens que variaram de 10^6 a 10^9 UFC/g. *Lactobacillus* spp. foram encontrados em níveis subdominantes com contagens médias de $5,0 \times 10^7$ UFC/g.

Queijos artesanais Roncal e Idiazabal elaborados artesanalmente na Região autônoma de Navarra, Espanha, apresentaram contagens médias de $1,4 \times 10^5$ UFC/g de *Enterococcus* spp., sendo as espécies mais encontradas *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium*, *Enterococcus durans* e *Enterococcus avium* (Arizcum *et al.* , 1997). Resultados semelhantes foram encontrados em pesquisa realizada em queijos artesanais Asiago, Montasio, Monte Veronese e Fontina produzidos na Itália. Dos 124 isolados de *Enterococcus* spp, 82 foram identificados como *Enterococcus faecalis*, 27 como *E. faecium*, nove como *E. durans*, quatro como *E. gallinarum* e dois como *E. hirae* (Andrighetto *et al.* , 2001).

Elevadas contagens de BAL ($>10^9$ UFC/g) foram encontradas em queijos Cebreiro, um queijo fresco pouco maturado elaborado a partir de leite cru no nordeste da Espanha. De um total de 126 isolados de bactérias ácido-láticas, 59 foram identificadas como *Enterococcus* spp. (38 como *Enterococcus faecalis*), 30 como *Lactococcus* spp. (24 como *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*), 25 como *Leuconostoc* spp. (14 como *Leuconostoc mesenteroides*) e seis foram identificadas como lactobacilus mesofílicos. *Micrococcus* ocorreu em baixas contagens ($<10^5$ UFC/g) (Centeno *et al.* , 1996).

Em queijos artesanais da Irlanda, *Lactococcus* foi o gênero mais isolado seguido de *Lactobacillus*. Ao longo da maturação do queijo houve aumento significativo na prevalência de *Lactobacillus* spp. (Quigley *et al.* , 2012). Resultado semelhante foi visto em queijo pecorino, na Toscana, Itália, no qual *Lactococcus lactis* foi a espécie de bactéria ácido-láctica mais frequente (Turchi *et al.* , 2013).

Lactococcus lactis, *Lactobacillus paracasei*, *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium*, *Enterococcus durans*, e *Leuconostoc mesenteroides* foram as espécies mais prevalentes em queijo Ossau-Iraty, um queijo artesanal produzido no sudoeste da França a partir de leite cru de ovelha. *Lactococcus* spp. atingiu as maiores contagens no queijo (5×10^1 a $1,6 \times 10^8$ UFC/g), seguido de *Leuconostoc* spp. ($1,9 \times 10^2$ a $6,3 \times 10^7$ UFC/g) e de *Enterococcus* spp. ($1,6 \times 10^2$ a $3,2 \times 10^6$ UFC/g). Ao longo da maturação de 120 dias, *Lactobacillus* foi o gênero que mais apresentou crescimento na sua contagem, saindo de uma contagem de 10^1 UFC/g para $1,3 \times 10^7$ UFC/g (Feutry *et al.* , 2012).

Em estudo realizado em queijo artesanal Feta, grego, a contagem média de BAL variou de 4×10^4 UFC/g, no dia da produção, a $2,1 \times 10^8$ UFC/g, com 120 dias de maturação. *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus pentosus* e *Lactobacillus paraplantarum* foram os micro-organismos mais encontrados durante a maturação do queijo. *Streptococcus thermophilus* e *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* foram detectados em níveis elevados até 20 dias de maturação, e então, gradualmente, reduzidos aos 120 dias de maturação. *Enterococcus faecium* foi encontrado em todas as etapas de fabricação e de maturação do queijo (Manolopoulou *et al.* , 2003). Contagem alta de BAL também foi encontrada em queijo artesanal Corrientes, argentino, com média de $5,3 \times 10^8$ UFC/g (Vasek *et al.* , 2013).

Em estudo realizado em queijo artesanal Castelmagno PDO da região do Vale de Grana, noroeste da Itália, bactérias ácido-láticas foram identificadas e quantificadas em altas proporções pela utilização de métodos dependentes e independentes de cultivo celular. Métodos dependentes de cultura destacaram o domínio inicial de uma população estreptocócica, com a predominância das espécies *Streptococcus thermophilus* e *S. agalactiae*. *Lactococcus* spp. ocorreu entre os isolados durante a elaboração e no primeiro mês de maturação do queijo, com médias de $1,26 \times 10^8$ a $3,9 \times 10^5$ UFC/g, sendo *Lactococcus lactis* a espécie mais frequente. *Lactobacillus* spp. apresentaram contagens médias entre $1,26 \times 10^8$ a $1,3 \times 10^6$ UFC/g, durante os 150 dias de maturação, sendo *Lactobacillus plantarum* e *Lactobacillus casei* as espécies prevalentes, ao longo deste período. Análises independentes de cultura salientaram o papel inegável de *Lactococcus lactis*, ativamente, envolvido no processo de elaboração e maturação do queijo Castelmagno PDO. *Lactobacillus helveticus*, embora não tenha sido identificado em meios seletivos de cultura, foi detectado em amostras de queijos curados, por método independente de cultivo. Por outro lado, *Lactobacillus plantarum* que foi amplamente isolado a partir das placas, entre os *Lactobacillus* presentes, não foi detectado por análise direta. *Enterococcus* spp. desenvolveram com uma tendência semelhante à *Lactococcus* spp. e *Lactobacillus* spp., porém, com menores contagens médias, apresentando no máximo $3,2 \times 10^6$ UFC/g no queijo recém produzido (Dolci *et al.* , 2010). Resultados semelhantes, usando a mesma tecnologia, foram descritos por Alegria *et al.* . (2009) ao analisarem queijos Casín, espanhol, com a exceção da identificação de *Leuconostoc* spp. em contagens que variaram de $1,6 \times 10^3$ a $1,7 \times 10^6$ UFC/g, ao longo de 30 dias de maturação do queijo.

3.7.5. Bolores e leveduras

Os bolores e leveduras são micro-organismos significativos no processo de maturação do queijo (Ferreira e Viljoen 2003; Fadda *et al.* , 2004). Quando presentes no queijo podem contribuir positivamente para o desenvolvimento do sabor durante a fase de maturação, devido a produção de etanol, acetaldeído, etilacetato e etil butirato, resultantes da fermentação da lactose (Welthagen e Viljoen, 1999). Em contraste, podem também levar à deterioração do produto,

como a produção de gás, descolorações, mudanças na textura e no sabor dos queijos (Borelli *et al.*, 2006b).

Borelli *et al.* (2006b) ao analisarem queijo da Serra da Canastra encontraram contagens entre $2,5 \times 10^3$ UFC/g a $7,9 \times 10^7$ UFC/g de bolores e leveduras. Em queijos Minas artesanais da Serra do Salitre as contagens médias de bolores e leveduras foram de $1,8 \times 10^4$ UFC/g, variando de $5,6 \times 10^2$ a 10^6 UFC/g (Lima *et al.*, 2009). Em amostras de queijos coloniais, com e sem inspeção, da microrregião de Francisco Beltrão- PR foram encontradas contagens entre 2×10^1 a $2,4 \times 10^6$ UFC/g (Silva e Silva, 2013)

A contagem de bolores e leveduras variou de $1,9 \times 10^4$ a $4,8 \times 10^8$ UFC/g nas amostras queijo de coalho e de $1,5 \times 10^4$ a $2,8 \times 10^8$ UFC/g nas amostras de queijo de manteiga, produzidos no Rio Grande no Norte (Feitosa *et al.*, 2003). Alta contagem também foi relatada na avaliação de bolores e leveduras em QMA elaborado em queijarias não cadastradas na região da Canastra, em que a média foi de $1,2 \times 10^8$ UFC/g (Resende, 2010).

As contagens de bolores e leveduras em queijo Serrano, aos 7 dias de maturação no verão foram de 5×10^4 UFC/g e $1,1 \times 10^6$ UFC/g, respectivamente. Estes valores foram superiores aos encontrados no inverno, de $3,3 \times 10^2$ UFC/g e $3,2 \times 10^5$ UFC/g, respectivamente. Esta diferença entre as estações não foi observada no queijo maturado por 14 dias, que apresentou contagem de bolores e leveduras de $4,7 \times 10^3$ UFC/g e $6,5 \times 10^4$ UFC/g, respectivamente, no verão, e de $4,4 \times 10^2$ UFC/g e $3,9 \times 10^4$ UFC/g, no inverno (Souza *et al.*, 2003). De forma semelhante, não foram observadas diferenças nas contagens de bolores e leveduras em QMA de Campo das Vertentes entre o período seco, que apresentou contagens médias de 10^6 UFC/g e o período chuvoso, com contagem média de $2,2 \times 10^6$ UFC/g (Oliveira, 2014).

Em estudo realizado em queijo Pecorino Crotonese, produzido no sul da Itália, foi reportada alta contagem de leveduras, em média de 10^5 UFC/g. Esta contagem se manteve alta durante todo o período de maturação analisado (60 dias) (Gardini *et al.*, 2006). Da mesma forma, em pesquisa realizada em queijo artesanal Feta, grego, a contagem de leveduras variou de $3,8 \times 10^2$ UFC/g a $1,6 \times 10^5$ UFC/g, ao longo de 120 dias de maturação (Manolopoulou *et al.*, 2003).

Em trabalho realizado em queijo Serra da Estrela, Portugal, as contagens médias de bolores caíram de $2,1 \times 10^7$ UFC/g aos 60 dias de maturação, para $1,6 \times 10^1$ UFC/g, aos 150 dias de maturação. Ao final de 180 dias de maturação, não houve mais a contagem de bolores no queijo (Dahl *et al.*, 2000). Resultado semelhante foi observado em queijos artesanais Sardo, italianos, que apresentaram contagens médias de bolores de 4×10^3 UFC/g, após 48hs de fabricação, e redução, significativa, das contagens para 4,5 UFC/g após 9 meses de maturação (Fadda *et al.*, 2004).

Em estudo realizado em queijo artesanal Castelmagno PDO, leveduras atingiram os maiores valores, correspondentes a $7,9 \times 10^4$ UFC/g e $3,2 \times 10^5$ UFC/g, no núcleo e na camada sob a casca, respectivamente, em queijos curados por 30 dias. Houve redução gradativa destas contagens para cerca de 10^2 UFC/g no queijo curado por 150 dias (Dolci *et al.*, 2010). Resultados semelhantes foram descritos por Alegría *et al.* (2009) ao analisarem queijos Casín, espanhol, no qual as contagens médias de bolores e leveduras variaram de $2,4 \times 10^3$ a 10^7 UFC/g, em queijos maturados por 30 dias.

Em diferentes queijos elaborados a partir de leite cru coletados de várias fontes nos EUA, 24 das 41 amostras apresentaram contagens entre 10^1 e 10^4 UFC/g de bolores e leveduras (Brooks *et al.*, 2012).

3.8. Qualidade físico-química de queijos artesanais

As características físico-químicas de um queijo são determinadas, inicialmente, pela composição das matérias-primas utilizadas, pela técnica de fabricação empregada, pela condição ambiental, como umidade do ar, temperatura e ventilação, a que esse queijo é submetido e pelo tipo de cultura de BAL presentes tanto em seu início quanto em sua fase final de maturação. Diferenças nos resultados dos parâmetros físico-químicos entre queijos Minas artesanais também podem ser justificadas pela grande variação na quantidade do fermento endógeno e do coalho adicionados ao leite e no tempo de coagulação da massa, durante sua produção (Borelli, 2002; Ornelas, 2005; Silva, 2007).

3.8.1. Extrato seco total

O extrato seco total (EST) está relacionado com as quantidades de nutrientes totais presentes no queijo. É representado pelo teor de gordura, lactose, proteína e minerais no produto final (Melício *et al.*, 2005). Em queijo Minas artesanal, a legislação determina um valor mínimo de 54,1% (Minas Gerais, 2008).

Queijos Minas artesanais produzidos na microrregião do Serro apresentaram EST de 52,18 %, enquanto que na Serra da Canastra e no Cerrado estes valores foram de 52,80% e 51,77%, respectivamente (Oliveira *et al.*, 2013).

A porcentagem de EST em queijos Minas artesanais da Serra da Canastra foi avaliada por Silva *et al.* (2011) em duas estações do ano. No verão, o EST foi de 55,07% e no inverno, de 57,47%. Não houve diferença ($p>0,05$) entre os períodos avaliados. Costa Junior *et al.* (2009) ao avaliarem este mesmo queijo da Serra da Canastra, por meio de análise estatística descritiva, encontraram EST de 61,2 % no período verão e 48% no período inverno. Em propriedades não cadastradas, localizadas ainda na região da Serra da Canastra, o EST de QMA foi de 56,51% (Resende, 2010).

Queijo Minas artesanal de Campo das Vertentes apresentou EST de 67,4 % no período chuvoso e 61% no período seco (Moreno, 2013). Resultados semelhantes foram descritos por Oliveira (2014) ao avaliar este mesmo queijo na região, no qual os valores de EST para o período chuvoso e de seca foram de 63,17% e 60,55%, respectivamente. Em ambos os trabalhos, não houve diferença ($p>0,05$) de EST nos queijos entre os períodos avaliados.

3.8.2. Umidade

A determinação de umidade no queijo é uma das medidas mais importantes na sua avaliação físico-química, uma vez que está relacionada com a qualidade, composição dos queijos e, sobretudo, com a segurança de consumo deste produto, podendo afetar o tempo de estocagem, embalagem e processamento. Sabe-se que a quantidade de água no queijo pode determinar a microbiota presente no produto e, assim, permitir maiores ou menores contagens de patógenos (Zottola e Smith, 1991).

O teor de umidade em um queijo é determinado por uma série de fatores como o tamanho do grão obtido no corte da coalhada, velocidade, tempo e temperatura de mexedura da massa, temperatura e umidade relativa do ar, o teor de sal presente e o tempo de maturação do queijo. A legislação quanto à umidade em queijo Minas artesanal determina máximo de 45,9% de umidade do produto. Desta forma, ele pode ser classificado como um queijo de média umidade pela legislação federal vigente (Brasil, 1996; Minas Gerais, 2008).

Queijos Minas artesanais das microrregiões do Serro, Serra da Canastra e Cerrado apresentaram umidade média de 47,83%, 44,90% e 46,50%, respectivamente. (Oliveira *et al.* , 2013). Pinto (2004) ao avaliar o QMA do Serro encontrou umidade média de 48,22%, enquanto Machado *et al.* (2004) encontraram valor médio de umidade de 50,84% em queijos da mesma região.

A umidade média de queijo Minas artesanal de propriedades localizadas na região de Araxá foi de 45,05%, variando de 39% a 49,45% (Araújo, 2004). Em trabalho semelhante, com propriedades não cadastradas na região da Serra da Canastra (Minas Gerais), a umidade média dos QMA foi de 43,49% (Resende, 2010). Em outro estudo, na mesma região, a umidade de QMA foi de 44,93% no verão e 42,52% no inverno (Silva *et al.* , 2011). Resultados diferentes foram descritos por Costa Junior *et al.* (2009) que encontraram umidade de 38,8% no verão e 52% no inverno, no mesmo queijo mencionado.

Em trabalho realizado na região de Campo das Vertentes, a umidade média dos QMA analisados foi de 32,6%, no período chuvoso, e de 39%, no período seco (Moreno, 2013). Oliveira (2014), em pesquisa com QMA da mesma região, encontrou valores de 36,83% e 39,45%, nos períodos de chuvas e seca, respectivamente. Em ambos os estudos, não houve diferença ($p > 0,05$) entre os períodos avaliados. Valor superior de umidade foi relatado em QMA de São João del-Rei, município de Campo das Vertentes, em que a porcentagem de umidade presente nos queijos foi em média de 58,3% (Oliveira, 2010).

A umidade média de queijos artesanais produzidos em diferentes regiões dentro e fora de Minas Gerais é bastante variável. Em feiras livres da cidade de Uberlândia-MG, a umidade média de QMA foi de 40,87%, enquanto que os produzidos em Montes Claros foi de 48,05% (Rezende *et al.* , 2010; Lempk *et al.* , 2013). Em queijos artesanais da região de Londrina-PR, a umidade variou de 34,66% a 68,96% (Ricardo *et al.* , 2011). Em queijo coalho artesanal produzido em Calçado, Pernambuco, o valor médio de umidade dos queijos estudados foi de 55,40% (Freitas Filho *et al.* , 2012).

Em queijo de coalho processado a partir de leite cru, à semelhança do QMA, no sertão alagoano, a porcentagem média de umidade foi de 45,50% (Silva *et al.* , 2010). À semelhança deste trabalho, a umidade média de queijo Minas artesanal da Serra da Canastra, aos oito dias de maturação à temperatura ambiente, foi de 45,42% nas águas e de 44,79% nas secas. Não houve diferença ($p > 0,05$) nas umidades médias avaliadas (Dores, 2007).

3.8.3. Gordura

A gordura é um dos principais componentes responsáveis pela característica sensorial do QMA. Ao longo da maturação, a lipólise representa uma importante reação bioquímica para o aparecimento do aroma e textura desejados ao produto final. No queijo, as lipases podem provir do leite, do coagulante e das bactérias iniciais, sobretudo, os bolores, que são os microorganismos mais lipolíticos presentes (Choisy *et al.* , 1987).

A composição de gordura no queijo varia conforme a composição do leite do qual é obtido, que pode apresentar diferenças significativas no seu teor de gordura conforme o período do ano e período do dia em que foi coletado, grau de sangue do rebanho e fase de lactação dos animais (Costa *et al.* , 1992). Esta variação é mais fortemente observada no QMA, devido ao fato de ser produzido com o teor de gordura original do leite cru, ou seja, a partir de leite não padronizado. Além disso, diferentes períodos de maturação do QMA determinam diferenças no processo de evaporação, que determinam queijos com maiores ou menores concentrações de gordura no produto final (Costa Júnior *et al.* , 2009).

Queijos Minas artesanais da região da Serra da Canastra, Serro e Cerrado apresentaram porcentagem média de gordura de 23,62%, 28% e 27,62%, respectivamente. O queijo da Serra da Canastra apresentou teor de gordura inferior ($p < 0,05$) ao encontrado nos queijos das demais regiões (Oliveira *et al.* , 2013).

Em queijo Minas artesanal da Serra da Canastra, a porcentagem de gordura presente nos queijos foi de 27,6%, no verão, e de 21,8%, no inverno (Costa Júnior *et al.* , 2009). Silva *et al.* (2011) ao avaliar este mesmo queijo, nos dois períodos do ano, encontrou valores de 27,59% de gordura no verão e de 28,51% no inverno.

A porcentagem de gordura de queijo Minas artesanal de propriedades não cadastradas, localizadas na região da Serra da Canastra, foi de 27,58%. Já em trabalho realizado na mesma região em queijo da Serra da Canastra, aos 8 dias de maturação à temperatura ambiente, foi encontrado um valor médio de 26,88%, nas águas, e 30,19%, na seca (Dores, 2007). Não houve diferença ($p > 0,05$) entre os períodos avaliados.

Queijo Minas artesanal de Araxá apresentou porcentagem de gordura média de 28,29%, com mínimo de 23% e máximo de 35,5% (Araújo, 2004). Resultados semelhantes foram descritos em pesquisa realizada no QMA do Serro em que a porcentagem de gordura presente nos queijos foi de 28,21%, em um trabalho, e de 29,22%, em outro (Pinto, 2004, Machado *et al.* , 2004).

Em pesquisa realizada em Campo das Vertentes, a porcentagem de gordura nos queijos foi 34,1%, no período chuvoso, e de 33,4%, no período seco, em queijos de até 30 dias de maturação (Moreno, 2013). Em trabalho semelhante na mesma região, os valores reportados em queijos de até 60 dias de maturação foram de 38,51%, nas chuvas, e de 32,82%, nas secas. Em ambos trabalhos, não houve diferença ($p > 0,05$) entre os períodos estudados (Oliveira, 2014).

Queijos artesanais da região de Londrina-PR apresentaram teor de gordura entre 26,81% e 56,18% (Ricardo *et al.* , 2011), enquanto os comercializados na microrregião de Montes Claros apresentaram em média 26,34% de gordura (Lempk *et al.* , 2013). Queijo de coalho processado no sertão alagoano, a partir de leite cru, apresentou porcentagem de gordura média de 48,16% (Silva *et al.* , 2010).

3.8.4. pH

O Potencial Hidrogeniônico (pH) consiste num índice que indica a acidez, neutralidade ou alcalinidade de um meio qualquer (Scott, 2002). Os valores de pH em queijos Minas artesanais são bastante variáveis, devido as variações observadas no processo de elaboração deste queijo. Neste sentido, a quantidade de coalho adicionado ao leite, a qualidade do leite cru, o tipo de bactéria ácido-lática e de outros micro-organismos presente no leite e no pingo e o

tempo/temperatura de maturação estão diretamente relacionados ao valor de pH encontrado no QMA.

A determinação do pH no QMA indica o grau de deterioração do queijo (Cecchi, 2003), fator importante na determinação da sua vida útil, além de ser importante indicador da segurança de consumo deste produto. A redução do pH do queijo, para valores entre 4,5 e 5,5, principalmente ocasionada pela produção de ácido láctico pelas BAL presentes no leite, pingo e, conseqüentemente, no queijo, contribui para a prevenção do crescimento de bactérias patogênicas e da maioria dos micro-organismos deteriorantes do queijo (Noronha, 2014).

O pH encontrado em queijo Minas artesanal, de propriedades não cadastradas localizadas na região da Serra da Canastra foi de 5,34 (Resende, 2010). Aos oito dias de maturação, este mesmo queijo quando maturado à temperatura ambiente, apresentou pH de 5,03, nas águas, e de 5, no período seco (Dores, 2007). Em trabalho semelhante, Silva *et al.* (2011) encontraram, no verão, pH médio dos queijos de 5,14 e, no inverno, de 5,36.

QMA de Campo das Vertentes, maturado por 30 dias, apresentou pH de 5,3, no período chuvoso, e 5, no período seco (Moreno, 2013). Valores semelhantes foram descritos por Costa Junior *et al.*, (2014) em pesquisa realizada na mesma região, em que o pH do queijos no período chuvoso variou de 5,1 a 5,5 e no período seco de 5 a 5,1. Em trabalho realizado em São João del-Rei, município pertencente a região de Campo das Vertentes, o pH médio encontrado nos queijos foi de 6,04, o maior valor até então relatado na região (Oliveira, 2010).

Em trabalhos realizados na região do Serro, no mesmo ano, os valores de pH encontrados nos QMA recém elaborados (6 a 8 dias) foram de 4,75 e 4,98 (Pinto, 2004, Machado *et al.*, 2004). Em pesquisa semelhante na região de Araxá, o valor médio de pH relatado nos queijos foi de 4,85, variando de 4,39 a 5,23 (Araújo, 2004).

3.8.5. Acidez titulável

A acidez titulável em queijos se refere a quantidade de ácido láctico presente em uma amostra (Cecchi, 2003). Ela pode variar conforme o cultivo láctico presente no queijo e no pingo, a quantidade de sal adicionada ao processo, tempo e temperatura durante a prensagem do queijo, tamanho do grão obtido no corte da coalhada, entre outros fatores que variam ao longo de sua produção (Scott, 2002).

As bactérias ácido-láticas presentes no queijo são capazes de fermentar lactose, como substrato para suas funções vitais, levando a formação de grande quantidade de ácido láctico durante as fases iniciais de produção do QMA e ao longo de todo o seu processo de maturação. O aumento da concentração de ácido láctico no queijo leva a diminuição do pH. Entretanto, não existe uma correlação entre os valores de acidez e pH encontrados, uma vez que este mede a quantidade de íons hidrogênio no meio (Scott, 2002) e a acidez a quantidade de ácido que está disponível para reagir com uma base (Cecchi, 2003).

Queijos Minas artesanais da região da Serra da Canastra, Serro e Cerrado apresentaram médias de acidez de 0,48%, 0,46% e 0,40%, respectivamente. Não houve diferença ($p > 0,05$) entre as regiões avaliadas (Oliveira *et al.*, 2013).

Na Serra da Canastra, a acidez relatada em QMA obtidos de propriedades não cadastradas foi de 0,65% (Resende, 2010). Aos oito dias de maturação, a acidez relatada neste mesmo queijo foi de 0,76%, no período das águas, e de 0,67%, no período da seca (Dores, 2007). Em trabalho avaliando-se também os dois períodos do ano foi relatado 1,11% de acidez nos queijos produzidos no verão e 1,29% nos produzidos no inverno (Silva *et al.*, 2011).

No Serro, trabalhos revelaram a porcentagem média de acidez titulável em QMA recém elaborados (6 a 8 dias) de 0,28% e 0,97% (Machado *et al.*, 2004; Pinto, 2004). Em Araxá, QMA apresentaram variações de 0,51% a 1,19% de ácido láctico (Araújo, 2004).

3.8.6. Proteína total

As diferenças no percentual de proteínas no QMA podem ser decorrentes das etapas de elaboração do queijo, entre elas, perdas protéicas durante o processo de dessora, ocasionando diminuição do rendimento da massa, tempo de maturação variável e a quantidade de coalho adicionada à massa, que, quando em excesso, pode ocasionar maior proteólise, implicando na redução do teor de proteínas (Spreer, 1991; Scott, 2002). Como resultado de contaminação ambiental, a presença de psicotróficos no QMA pode contribuir para essa degradação protéica, pela ação de enzimas proteolíticas termorresistentes (Wolfschoon-Pombo, 1983).

Queijos Minas Artesanal produzidos nas microrregiões do Serro, da Serra da Canastra e do Cerrado apresentaram 14,08%, 18,51% e 14,55% de proteína, respectivamente (Oliveira *et al.*, 2013). No Serro, outros dois trabalhos relataram a presença de 17,06% e 22,40% de proteína nas amostras analisadas (Machado *et al.*, 2004; Pinto, 2004).

Na região da Serra da Canastra, a proteína total de queijo Minas artesanal, de propriedades não cadastradas, foi de 23,18%. Aos oito dias de maturação, estes queijos apresentaram 24,75% de proteína, nas águas, e 24,64%, nas secas (Dores, 2007). Em outros dois trabalhos semelhantes na região, Silva *et al.* (2011) encontraram porcentagens médias de proteína iguais a 24,81% e 23,07%, e Costa Junior *et al.* (2009) encontraram valores de 22,3% e 19%, no verão e inverno, respectivamente, em queijos maturados por até 60 dias. Em nenhum dos trabalhos houve diferença significativa entre os períodos estudados.

Em estudo realizado na região de Campo das Vertentes, a porcentagem média de proteína no QMA maturado por até 60 dias foi 18% (Oliveira, 2010). Moreno (2013) ao avaliar este mesmo queijo, ao longo de 30 dias de maturação, encontrou valores de 24,1% de proteína, no queijo produzido no período chuvoso, e de 22,57% do queijo produzido no inverno. Resultados semelhantes foram vistos nos QMA elaborados na região de Araxá, em que os valores de proteína nos queijos variaram de 21,83% a 29,86% (Araújo, 2004).

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Amostragem e aquisição de queijo Minas artesanal fresco, água, leite cru e soro-fermento

Por meio de reunião com técnicos da EMATER, foram relacionados os únicos seis produtores de queijo Minas artesanal não cadastrados no IMA, na mesorregião de Campo das Vertentes, que utilizavam soro-fermento. As propriedades rurais estavam distribuídas entres os municípios de São João del-Rei, Tiradentes, Prados e Carrancas.

A coleta das amostras, no período da chuva, foi efetuada no mês de dezembro de 2013, em duas propriedades, e no mês de abril de 2014, quando as outras quatro propriedades passaram a ter interesse no cadastramento de suas queijarias. A coleta das amostras, no período seco, foi efetuada no mês de julho de 2014, nas seis propriedades. Foram recolhidos queijos com um dia de produção, tendo em vista que alguns produtores elaboravam apenas um queijo por dia, leite utilizado para a produção do queijo, soro-fermento originado do queijo coletado e água da queijaria.

A coleta dos queijos foi realizada com papel alumínio estéril, sendo que estes eram retirados diretamente das prateleiras da queijaria. O leite cru, o soro-fermento e a água, esta última coletada diretamente da torneira da queijaria, foram coletados em frascos de vidro esterilizados. Para o leite, ainda foram coletadas amostras em frascos contendo o conservante azidiol, para contagem bacteriana, e o conservante bronopol, para contagem de células somáticas e composição centesimal.

As amostras de água, leite cru, soro-fermento e queijo, este último embalado em saco plástico de primeiro uso, foram, após a realização das coletas, acondicionadas em caixas isotérmicas com gelo reciclável, sendo enviadas, em um prazo máximo de 24 horas, para os laboratórios do Departamento de Tecnologia e Inspeção de Produtos de Origem Animal da Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais (DTIPOA/EV/UFMG). Nos laboratórios de Microbiologia de Alimentos e Físico Química I foram realizadas as pesquisas microbiológicas e físico-químicas, respectivamente, e no Laboratório de Análise de Qualidade do Leite (LabUFMG), credenciado ao MAPA, a Contagem Bacteriana Total, a Contagem de Células Somáticas e a composição centesimal do leite.

4.2. Perfil das propriedades amostradas e queijarias produtoras de queijo Minas artesanal fresco

Durante as visitas as propriedades no período da seca, aplicou-se um questionário (anexo 1) para conhecimento geral do estabelecimento, focando-se na caracterização do rebanho/sistema de produção e procedimentos adotados ao longo da elaboração do QMA. Também, durante a visita, foram exibidos e discutidos os resultados das análises do período da chuva, tendo em vista a legislação pertinente ao QMA e as implicações do consumo do queijo ali produzido. Orientações quanto à aplicação de boas práticas agropecuárias e de fabricação foram dadas, com destaque, a cada um dos proprietários. Houve retorno às propriedades estudadas, ao fim do experimento, com os dados finais já computados, no qual os resultados do período de seca foram comparados com os do período de chuva, pontuando as melhorias obtidas nas etapas de produção do QMA.

4.3. Análises laboratoriais

Os materiais coletados foram submetidos às análises microbiológicas, segundo a Instrução Normativa nº 62 de 2003 do MAPA (Brasil, 2003). Alíquotas de 1mL de água, leite e soro-fermento foram adicionadas em tubos contendo 9mL de salina peptonada 0,1% para a formação da diluição 10^{-1} . Para as análises dos queijos, foram pesados 25g da amostra, coletados de diferentes porções e profundidades, e adicionados em 225mL do mesmo diluente, também, para composição da diluição 10^{-1} . Após homogeneização, seguiram-se diluições seriadas em salina peptonada 0,1%, até atingirem a concentração desejada para análises microbiológicas.

4.3.1. Qualidade microbiológica e físico-química de água

Foram pesquisados em água os parâmetros microbiológicos Número Mais Provável de coliformes a 30°C e a 45°C, contagem de mesófilos aeróbios e bactérias ácido-láticas. Os parâmetros físico-químicos, dureza, pH e cloro residual, foram realizados em triplicata conforme metodologia proposta por Macêdo (2005).

Os resultados obtidos foram comparados aos parâmetros microbiológicos e físico-químicos determinados pelas legislações estaduais e legislação federal (Minas Gerais, 2002b; Minas Gerais, 2008; Brasil, 2012b) presentes nas tabelas 2 e 3 (item 3.3), respectivamente.

4.3.2. Qualidade microbiológica de soro-fermento

Os parâmetros microbiológicos de qualidade de soro-fermento analisados foram Número Mais Provável de coliformes a 30°C e a 45°C; contagens de *Staphylococcus coagulase* positivo, bactérias ácido-láticas (BAL), bolores e leveduras e presença de *Salmonella* spp..

4.3.3. Qualidade microbiológica e físico-química de leite cru

Em leite cru utilizado para elaboração de queijo Minas artesanal, os parâmetros de qualidade microbiológica pesquisados foram: NMP de coliformes a 30°C e a 45°C; contagens de *Staphylococcus coagulase* positivo, bactérias ácido-láticas (BAL) e bolores e leveduras e presença de *Salmonella* spp.

As amostras de leite contendo o bronopol foram encaminhadas ao LabUFMG para determinação dos teores percentuais de gordura, de proteína, de lactose e de extrato seco total, em equipamento eletrônico Bentley CombiSystem 2300® da *Bentley Instruments Incorporated*® (Bentley..., 1998), segundo o método de absorção de comprimento de onda na região do infravermelho (International..., 2000). Ainda, no equipamento eletrônico Bentley CombiSystem 2300® (*Bentley Instruments Incorporated*®, Chaska, Minnesota, Estados Unidos) (Bentley..., 1998), pelo método de citometria de fluxo (International..., 1995), foi realizada a contagem de células somáticas no leite. As amostras de leite adicionadas do conservante azidiol foram avaliadas quanto à Contagem Bacteriana Total pela metodologia de citometria de fluxo (Suhren e Walte, 2000) em equipamento eletrônico IBC BactoCount IBC (*Bentley Instruments Incorporated*®, Chaska, Minnesota, Estados Unidos) (Bentley..., 2002).

Os resultados obtidos foram comparados aos parâmetros microbiológicos e físico-químicos determinados pela legislação estadual (Minas Gerais, 2002b) presentes nas tabelas 4 (item 3.5) e 5 (item 3.6), respectivamente.

4.3.4. Qualidade microbiológica de queijo Minas artesanal fresco

Os parâmetros microbiológicos de qualidade de queijo Minas artesanal do Campo das Vertentes foram NMP de coliformes a 30°C e a 45°C; contagens de *Staphylococcus coagulase* positivo, bactérias ácido-láticas (BAL) e bolores e leveduras e presença de *Salmonella* spp.

Os resultados obtidos foram comparados aos parâmetros microbiológicos determinados pela legislação estadual (Minas Gerais, 2008) presentes na tabela 6 (item 3.7). Embora a legislação estadual não seja específica para queijo Minas artesanal fresco, ela é a única que estabelece parâmetros de inspeção para um produto elaborado a partir de leite cru e soro-fermento. Da mesma forma, foi também utilizada como parâmetro de comparação para os resultados médios de umidade dos queijos analisados.

4.3.5. Pesquisa de *Staphylococcus coagulase* positivo nos manipuladores de queijo Minas artesanal fresco

Amostras da mão direita, mão esquerda, orofaringe e narinas dos manipuladores de queijo Minas artesanal fresco foram submetidas à pesquisa de *Staphylococcus coagulase* positivo.

4.4. Metodologias utilizadas nas avaliações de parâmetros microbiológicos de qualidade

4.4.1. Pesquisa de *Staphylococcus coagulase* positivo nos manipuladores de queijo Minas artesanal fresco

A coleta das amostras biológicas foi autorizada por todos os manipuladores de QMA das seis propriedades. Em uma queijaria, duas pessoas alternavam na produção do queijo. Desta forma, a coleta de amostras para análise foi realizada nos dois indivíduos, totalizando sete manipuladores de alimentos.

Usando um *swab* estéril, embebido em solução de cloreto de sódio 0,9%, coletaram-se amostras das narinas, orofaringe e das duas mãos de cada manipulador. Os *swabs* foram acondicionados em meios de transporte especiais individuais (Stuart, ABSORVE/Citotest Labware Manufacturing CO) e mantidos em caixas isotérmicas com gelo reciclável, sendo enviados, em um prazo máximo de 24 horas, para o laboratório de Microbiologia de Alimentos do DTIPOA da Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais.

Cada *swab* foi estriado, por esgotamento, em uma placa de Petri contendo ágar Baird-Parker (BD, Franklin Lanes, Estados Unidos), enriquecido com emulsão de gema de ovo e telurito de potássio (*Himedia*) e outra placa contendo ágar sal manitol (*Himedia*, Mumbai, Índia), ambas incubadas a 36°C por 48 horas. Após crescimento, colônias típicas e atípicas das placas de ágar Baird Parker e colônias amarelas das placas de ágar sal manitol, sugestivas de *Staphylococcus coagulase* positivo, foram inoculadas em tubos contendo caldo Brain Heart Infusion (BHI) (BD) incubados por 24 horas a 36°C (Brasil, 2003). Aqueles tubos que apresentaram turvação do meio tiveram seu conteúdo semeado, por esgotamento, em placas de ágar sal manitol e ágar Baird Parker, incubadas por mais 24 horas a 36 °C. As colônias crescidas foram submetidas as seguintes provas morfológicas e bioquímicas de identificação de *Staphylococcus* spp.:

1) Coloração de Gram: foi realizada de acordo com Stinghen *et al* . (2002). Foi considerado resultado positivo a observação de bactérias cocos Gram positivo, agrupados em forma de cacho compatível com a morfologia de bactérias do gênero *Staphylococcus* spp.

2) Prova da catalase, feita em lâmina como descrita por Pilonetto e Pilonetto (1998). Foi realizada com colônias que mostraram resultado positivo na coloração de Gram. Nesta prova, uma colônia do meio de cultura, com o auxílio de uma alça descartável estéril, foi transferida para uma lâmina. Sobre essa colônia foi adicionada uma gota de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) a 3% e observada a produção de gás (resultado positivo) ou não (resultado negativo).

3) Prova da coagulase: foi realizada em tubo, no qual 300 µL da suspensão em caldo Brain Heart Infusion (BHI) (BD) recém-incubado foram adicionados lentamente, em tubo estéril, à mesma quantidade de plasma de coelho reconstituído (*Laborclin*, Vargem Grande dos Pinhais, Brasil). Após incubação por 24 horas a 37°C, foi avaliada a presença ou ausência de material coagulado no interior do tubo (Brasil, 2003).

4.4.2. Pesquisa de coliformes a 30°C e a 45°C

A técnica do Número Mais Provável (NMP) foi utilizada para pesquisa dos coliformes totais (a 30°C) e coliformes termotolerantes (a 45°C) (Brasil, 2003).

Para o teste presuntivo, 1mL das amostras de leite, soro-fermento e queijo, em diluições 10⁻¹, 10⁻² e 10⁻³ e 10⁻⁴, foi inoculado em série de três tubos contendo 9mL de caldo lauril sulfato de sódio simples (*Himedia*) e tubos de Durham invertidos. Para o mesmo teste, 10 mL das amostras de água foram inoculados em 10 mL de caldo lauril sulfato de sódio de concentração dupla (*Himedia*), na diluição de 10⁰ e 1mL em caldo lauril sulfato de sódio simples, nas duas diluições seguintes (*Himedia*). Esses tubos também continham tubos de Durham invertidos. Todos foram incubados em estufa a 36°C por 48 horas.

Os tubos considerados positivos no teste presuntivo foram aqueles que apresentaram formação de gás nos tubos de Durhan (mínimo 1/10 do volume total) ou efervescência quando agitado, gentilmente. Assim, com auxílio de uma alça esterilizada, estes tubos foram repicados para tubos contendo caldo verde brilhante bile lactose 2% (BD) e tubo de Durham invertidos, incubados em estufa a 36°C por 48 horas, para confirmação de coliformes totais. Para confirmação de coliformes termotolerantes, os mesmos tubos positivos no teste presuntivo foram repicados, com o auxílio de uma alça esterilizada, em tubos com caldo EC (*Himedia*) e tubos de Durham, e incubados em banho-maria a 45°C por 48 horas. Foram considerados positivos, nas provas confirmatórias, os tubos que apresentaram efervescência e formação de gás no interior dos tubos de Durham, a semelhança da prova presuntiva. Esses resultados foram comparados com os dados presentes na tabela de McGrady para cálculo final do NMP (Brasil, 2003).

4.4.3. Pesquisa de *Staphylococcus* spp. e *Staphylococcus* coagulase positivo

Alíquotas de 0,1mL das diluições 10⁻², 10⁻³, 10⁻⁴ e 10⁻⁵ das amostras de leite, soro-fermento e queijo foram inoculadas, com o auxílio da alça de Drigalski, em ágar Baird-Parker (BD) enriquecido com emulsão de gema de ovo e telurito de potássio (*Himedia*). As placas foram incubadas a 37°C, por 48 horas. Após crescimento, as colônias totais foram contadas para a pesquisa de *Staphylococcus* spp., e caracterizadas em típicas ou atípicas, para pesquisa de

Staphylococcus coagulase positivo. Em placas contendo apenas um tipo de colônia, foram selecionadas cinco colônias e inoculadas, separadamente, em tubos contendo caldo Brain Heart Infusion (BHI) (BD). Naquelas placas em que os dois tipos de colônias estavam presentes, três de cada tipo foram selecionadas e inoculadas, também, separadamente, em caldo BHI (BD). Após 24 horas a 37°C, 300µL da suspensão eram adicionados lentamente, em tubo estéril, à mesma quantidade de plasma de coelho reconstituído (Laborclin, Vargem Grande dos Pinhais, Brasil). Por fim, após incubação a 24 horas, a 37°C, era conferido a presença ou ausência de material coagulado no interior do tubo (Brasil, 2003).

4.4.4. Pesquisa de *Salmonella* spp.

A pesquisa de *Salmonella* spp. foi feita em leite, soro-fermento e queijo. Para leite e soro-fermento, 25mL foram inoculados em frascos contendo 225mL de salina peptonada tamponada 1%. No caso do queijo, foram adicionados à mesma solução 25 gramas de amostra. Estes frascos foram então incubados em estufa a $36^{\circ} \pm 1^{\circ}\text{C}$ por 16-20 horas, na etapa conhecida como pré-enriquecimento. Em seguida, para enriquecimento seletivo, foram transferidos 1 mL e 0,1 mL das amostras para caldo Selenito Cistina (*Himedia*) e Rappaport Vassiliadis (*Acumedia*, Baltimore, Estados Unidos), respectivamente. Os tubos foram então incubados em banho-maria a $41^{\circ}\text{C} \pm 0,5^{\circ}\text{C}$, por 24 horas. Após esse período, as amostras foram estriadas em meios sólidos seletivos para *Salmonella* spp., sendo eles: ágar verde brilhante vermelho de fenol lactose sacarose (BPLS) (*Acumedia*), ágar *Salmonella-Shigella* (SS) (*Acumedia*) e ágar Hektoen entérico (*Himedia*). As placas foram incubadas a $36^{\circ} \pm 1^{\circ}\text{C}$, por 24 horas. Para cada amostra, oito colônias consideradas sugestivas de *Salmonella* spp. foram selecionadas, entre as seis placas obtidas, e inoculadas em meio ágar Rugai modificado (Pessoa e Silva, 1972) para realização dos testes bioquímicos (indol, sacarose, LTD, H₂S, glicose, uréia, gás, motilidade e L-lisina). Aqueles tubos com leitura sugestiva de *Salmonella* spp. tiveram suas colônias selecionadas e incubadas em ágar nutriente (*Acumedia*) por 24 horas, a $36^{\circ} \pm 1^{\circ}\text{C}$. Por fim, estes tubos foram adicionados de salina peptonada 0,85%, para que fosse realizado o teste de confirmação sorológica por meio do soro anti-*Salmonella* polivalente O (*Probac*, São Paulo, Brasil) (Brasil, 2003).

4.4.5. Pesquisa de bolores e leveduras

Alíquotas de 0,1mL das diluições 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , para amostras de leite e soro-fermento, e das diluições 10^{-2} , 10^{-3} e 10^{-4} , para queijo, foram inoculadas em ágar batata dextrose 2% (*Acumedia*), adicionado de 10% de ácido tartárico estéril, com o auxílio de alça de Drigalski. As placas foram incubadas sem inverter, a $25 \pm 1^{\circ}\text{C}$ C, por sete dias, em incubadora de B.O.D. (Brasil, 2003).

4.4.6. Contagem padrão em placas de micro-organismos mesófilos aeróbios na água

Alíquota de um mL das diluições 10^0 , 10^{-1} e 10^{-2} foi semeado em placas de petri esterilizadas adicionadas de cerca de 15 a 20 mL de Plate Count Agar (PCA) fundido e mantido em banho-maria a 46-48°C, pelo método de *pour-plate*. Posteriormente, homogeneizou-se adequadamente o ágar com o inóculo e em superfície plana, esperou-se um período até solidificação total do ágar. As placas foram invertidas e incubadas a 36°C por 48 horas (Brasil, 2003).

4.4.7. Isolamento, enumeração e identificação molecular de bactérias ácido-láticas de água, leite cru, soro-fermento e queijo Minas artesanal fresco de produtores não cadastrados de Campo das Vertentes

O isolamento e enumeração de BAL de água, leite cru, soro-fermento e queijo Minas artesanal foi realizado no laboratório de Microbiologia de Alimentos do DTIPOA/Escola de Veterinária/UFMG.

A análise de biologia molecular foi realizada no Laboratório de Genética Molecular de Protozoários Parasitas do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais e no Laboratório de Genética da Escola de Veterinária/UFMG.

4.4.7.1. Enumeração de bactérias ácido-láticas

Alíquotas de 0,1mL das diluições 10^0 , 10^{-1} e 10^{-2} das amostras de água, 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} e 10^{-5} das amostras de leite, 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} e 10^{-6} das amostras de soro-fermento e 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} e 10^{-7} das amostras de queijo foram inoculadas (*spread-plate*) com a ajuda de alça de Drigalski em ágar Man – Rogosa – Sharpe (MRS) (Difco Laboratories Inc., Detroit, Estados Unidos) e M17 (Difco Laboratories Inc., Detroit, Estados Unidos) e incubadas em aerobiose, em estufa a 37°C, por 48 horas (International..., 1988; Resende, 2010).

4.4.7.2. Isolamento e seleção das colônias para identificação molecular

A partir de colônias que apresentavam aspectos morfológicos diferentes, nos dois meios de cultura utilizados, foram feitos esfregaços em lâminas para coloração pelo método de Gram. A partir dessas mesmas colônias foram feitos testes de catalase utilizando-se H_2O_2 (3%). As colônias Gram positivo e catalase negativas foram inoculadas em 4 mL de caldo MRS (*Difco*), para aquelas colônias selecionadas a partir da placa de MRS, e em caldo M17, para aquelas obtidas das placas de M17. Os caldos foram incubados a 37°C, durante 24 horas. Em seguida, uma alíquota de 0,8 mL de cada tubo foi transferida para tubo *ependorf* e adicionada de glicerol esterilizado (20%). Logo após, os tubos foram congelados a -18°C até o momento da identificação molecular.

4.4.7.3. Pré-tratamento das colônias e extração de DNA

A extração do DNA total dos micro-organismos isolados de ágar MRS e ágar M17 (Difco Laboratories Inc., Detroit, Estados Unidos) foi realizada a partir do cultivo recente em caldos MRS e M17 (Difco Laboratories Inc., Detroit, Estados Unidos), incubados sob aerobiose, a 37°C, durante 24 a 48 horas. Dessa forma, as culturas foram transferidas para microtubos de 1,5 mL e centrifugadas a 4000 x g/15minutos, sendo descartado o sobrenadante. O *pellet* foi suspenso em 1 mL de LiCl (5M) e incubado em temperatura ambiente sob agitação por 90 minutos. Após lavagem com água deionizada, as amostras foram centrifugadas a 4000 x g /15 minutos sendo descartado o sobrenadante. O *pellet* foi, então, tratado com 1 mL de lisozima (10mg/mL) em tampão protoplasmático (25 mM de sacarose, 50 mM de tris-HCl, pH 8,0, 10 mM de EDTA) e incubado por 60–90 minutos a 37°C. Após centrifugação a 8000 x g /15 minutos, o sobrenadante foi descartado. O produto final obtido foi o DNA *pelletizado*.

O DNA total dos protoplastos obtidos de cada amostra foi extraído com auxílio do *Kit Wizard SV Genomic DNA Purification System* da companhia *Promega Corporation* (Madison, Wisconsin, Estados Unidos), segundo instruções do fabricante. O DNA obtido de cada amostra foi quantificado em espectrofotômetro (NanoDrop® 2000-2000c), utilizando-se 1 µL do DNA.

4.4.7.4. Amplificação e sequenciamento da região 16S do rDNA

A identificação dos micro-organismos ao nível de espécie foi realizada a partir da amplificação e sequenciamento da região 16S do rDNA por Reação de Polimerização em Cadeia (PCR). As reações de amplificação foram realizadas utilizando 10 pmols dos *primers* 27F (5' AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG 3') e 1492R (5' GGT TAC CTT GTT ACG ACT T 3') descritos por Lane (1991), 20 ng de DNA molde e PCR Master Mix (*Promega Corporation*, Madison, Estados Unidos), com 0,2mM de cada desoxiribonucleotídeo trifosfato, 1,5mM de MgCl₂, 1,5 U de *Taq* DNA polimerase. O programa utilizado para amplificação foi: 1 ciclo (95°C por 2 minutos), 35 ciclos (95°C por 30 segundos, 55°C por 1 minuto e 72°C por 1 minuto) e o último ciclo (72°C por 5 minutos), de acordo com Moreira *et al.* (2005). Dez µL de cada amostra amplificada foram misturados a 2 µL de tampão (glicerol adicionado de azul de bromofenol) e, então, encaminhados à eletroforese em gel de agarose (1%), adicionado de 10 µL de brometo de etídeo, utilizando 100 V, durante 90 minutos. Ao final da corrida, os géis foram fotografados, para visualização das regiões amplificadas.

Os *amplicons* foram purificados utilizando o kit *Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System* (*Promega Corporation*, Madison, Estados Unidos) e sequenciados pelo método de Sanger, utilizando-se um sequenciador automático *MegaBACE 1000* (*GE Healthcare*, Piscataway, Estados Unidos), conforme metodologia proposta por Reysenbach *et al.*, (2000). As sequências obtidas foram comparadas com aquelas depositadas no GenBank, disponível no portal do Centro Nacional para Informação em Biotecnologia (NCBI - *National Center of Biotechnology Information* – <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>).

4.4.7.5. Diferenciação das espécies *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus paraplantarum* e *Lactobacillus pentosus* por meio de técnica de PCR multiplex

A distinção entre *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus paraplantarum* e *Lactobacillus pentosus* foi feita a partir da técnica de PCR *multiplex*, utilizando iniciadores específicos para amplificação da região do gene *recA*, segundo metodologia descrita por Torriani *et al.* (2001).

As reações de amplificação foram realizadas utilizando 2 pmols dos *primers* paraF (59-GTC ACA GGC ATT ACG AAA AC-39), pentF (59-CAG TGG CGC GGT TGA TAT C-39), planF (59-CCG TTT ATG CGG AAC ACC TA-39), e Prev (59-TCG GGA TTA CCA AAC ATC CA-39) descritos por Torriani *et al.* (2001), 100 ng de DNA e PCR Master Mix (*Promega Corporation*, Madison, Estados Unidos), com 0,2mM de cada desoxiribonucleotídeo trifosfato, 1,5mM de MgCl₂ e 1,5 U de *Taq* DNA polimerase. O programa utilizado para amplificação foi: 1 ciclo (94°C por 3 minutos), 30 ciclos (94°C por 30 segundo, 56°C por 10 segundos e 72°C por 30 segundos) e o último ciclo (72°C por 5 minutos). Dez µL de cada amostra foram misturados a 2 µL de tampão (glicerol adicionado de azul de bromofenol) e, então, encaminhados à eletroforese em gel de agarose (2%), adicionado de 20 µL de brometo de etídeo, utilizando 100 V, durante 90 minutos. Paralelamente, no mesmo gel, foi utilizado também o marcador de peso molecular de 1 Kb (mil pares de bases). Ao final da corrida, os géis foram fotografados, para

visualização das regiões amplificadas. O peso dos *amplicons* gerados são de 318 bp para *Lactobacillus plantarum*, 218 bp para *Lactobacillus pentosus* e 107 bp para *Lactobacillus paraplantarum* (Torriani *et al.*, 2001).

4.4.7.6. Diferenciação das espécies *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus paracasei* e *Lactobacillus rhamnosus* por PCR espécie-específico

A distinção entre *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus paracasei* e *Lactobacillus rhamnosus* foi realizada por PCR usando *primers* que são específicos para cada uma destas espécies com base em diferenças na região V1 do gene 16S rDNA, como descrito por Ward e Timmins (1999).

Para cada amostra foram realizadas três reações, cada uma contendo um par distinto de *primers*, nas seguintes combinações: Y2/casei; Y2/para; Y2/rham. As reações de amplificação, foram realizadas utilizando 10 pmols dos primers Y2 5'-CCCCTGCTGCCTCCCGTAGGAGT-3', *casei* 5'-TGCCTGAGATTCGACTTAA-3', *para* 5'-CACCGAGATTCAACATGG-3' ou *rham* 5'-TGCATCTTGATTTAATTTTG-3', descritos por Ward e Timmins (1999), 100 ng de DNA e PCR Master Mix (Promega Corporation, Madison, Estados Unidos), com 0,2mM de cada desoxiribonucleotídeo trifosfato, 1,5mM de MgCl₂ e 1,5 U de *Taq* DNA polimerase. O programa utilizado para amplificação foi: 1 ciclo (94°C por 3 minutos), 30 ciclos (94°C por 45 segundos, 55°C por 45 segundos e 72°C por 1 minuto) e o último ciclo (72°C por 5 minutos). Dez µL de cada amostra foram misturados a 2 µL de tampão (glicerol adicionado de azul de bromofenol) e, então, encaminhados à eletroforese em gel de agarose (2%), adicionado de 20 µL de brometo de etídeo, utilizando 100 V, durante 90 minutos. Paralelamente, no mesmo gel, foi utilizado também o marcador de peso molecular de 1 Kb (mil pares de bases). Após visualização do gel em transiluminador de UV, observou-se a presença ou a ausência de banda (*amplicon*) correspondente a amplificação do *primer* específico utilizado, para determinação da espécie em questão.

4.5. Qualidade físico-química de queijo Minas artesanal fresco

As análises físico-químicas do queijo Minas artesanal fresco foram realizadas no Laboratório de Análises Físico-Químicas I do DTIPOA/EV/UFMG. As seguintes análises foram realizadas: determinação dos teores percentuais de extrato seco total e umidade pelo método gravimétrico, gordura pelo método de Gerber, compostos nitrogenados pelo método de Kjeldahl, acidez titulável, pH e gordura no extrato seco (GES). A proteína total foi obtida pela multiplicação da % de nitrogênio total por 6,38. Todas as análises físico-químicas foram realizadas em triplicata de acordo com Brasil (2006).

4.6. Delineamento experimental e análise estatística

O delineamento experimental do trabalho foi em blocos ao acaso (2x6), no qual foram aplicados dois tratamentos (períodos de chuva e seca) em seis unidades experimentais/blocos (seis propriedades).

O teste de Shapiro-Wilk, cuja hipótese de nulidade expressa que os dados em questão têm distribuição normal, foi utilizado para verificar a pressuposição de normalidade (Shapiro e Wilk, 1965).

Todos os parâmetros microbiológicos e dois parâmetros físico-químicos da água, dureza e cloro residual, não apresentaram distribuição normal no teste de Shapiro-Wilk e, deste modo, tiveram suas medianas submetidas ao teste estatístico não paramétrico de Friedman, a um nível de significância (α) de 0,05. Os demais parâmetros físico-químicos obtidos no estudo apresentaram distribuição normal pelo teste de Shapiro Wilk e, desta forma, tiveram suas médias comparadas por análise de variância, em modelo estatístico de blocos ao acaso, utilizando teste F, a um nível de significância (α) de 0,05.

Todas as análises estatísticas foram realizadas no programa estatístico InfoStat/Profesional versão 2008.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Perfil das propriedades amostradas e queijarias produtoras de queijo Minas artesanal fresco

O perfil das propriedades e queijarias pesquisadas foi obtido por meio da aplicação de um questionário (anexo 1).

De forma geral, as propriedades, no momento do experimento, foram classificadas como sistemas semi intensivos, com 3 a 53 animais em lactação de produção média diária variando de 8,6L a 15L. Os animais eram mestiços de Holandês e Gir, sendo que em uma propriedade, os animais eram todos da raça Jersey. Com uso de inseminação artificial ou monta natural, os proprietários tentavam manter seus rebanhos em sistema fechado. Mas, quando necessário, a compra de animais de outras propriedades era efetuada.

O manejo dos animais era a pasto. No período da seca, recebiam concentrado, silagem de milho e, em alguns casos, cana e uréia. No período da chuva, se alimentavam do volumoso disponível, capim napier, mombaça ou braquiarião, sendo mantido o fornecimento de concentrado, durante a ordenha ou no cocho. Em todas as propriedades, era fornecido sal mineral aos animais.

Somente uma das propriedades realizava ordenha manual. As demais possuíam ordenha mecânica, sendo que apenas uma contava com sistema de circuito fechado. Todas as outras faziam uso do latão ao pé. As ordenhas eram realizadas sempre duas vezes ao dia. A limpeza e higienização dos equipamentos eram deficientes em todas as propriedades, em pelo menos um ponto. Em geral, os principais problemas levantados foram a ausência de utilização do detergente ácido, a circulação do detergente alcalino clorado em água à temperatura ambiente e a ausência de sanitização do equipamento antes do início das ordenhas. Em uma propriedade, os produtos de limpeza não eram circulados no equipamento de ordenha, por problemas mecânicos na bomba de circulação. Todos os proprietários realizavam a limpeza manual das partes externas do equipamento com uma solução de detergente, utilizando escovas próprias para este fim. Por meio de cálculo simples efetuado nas propriedades, que leva em consideração o número de vacas ordenhadas por dia, o número de ordenhas realizadas por dia e a quantidade de unidades de ordenha no equipamento, constatou-se atraso na troca do conjunto de teteiras em todas as propriedades.

Quanto ao manejo sanitário, em todas as propriedades, os animais eram vacinados contra brucelose e aftosa. O teste de tuberculização no rebanho, para o controle de tuberculose, era realizado em apenas três das seis propriedades. Durante as coletas, foram relatados alguns casos de mastite nos animais. O controle da mastite clínica, por meio do teste da caneca telada, era realizado em todos os estabelecimentos, enquanto o teste CMT, para detecção de mastite subclínica, em apenas dois. O tratamento de vaca seca com antimicrobianos só não era realizado em uma propriedade. Entretanto, a antibioticoterapia no tratamento dos casos clínicos de mastite era praticada em todas. O *pré-dipping* a base de iodo ou cloro não era rotina em duas propriedades e o *pós dipping* não era usado em apenas uma. Para controle de ectoparasitas, eram utilizados produtos comerciais de uso tópico (*pour on*), e em uma propriedade o pulverizador costal era utilizado para o banho de aspersão do produto nos animais. Um proprietário relatou fazer o uso de homoterápicos, esporadicamente, para controle de carrapatos.

A motivação principal em produzir o QMA veio após trabalho realizado pela EMATER na região, com o intuito de recuperar a tradição local do “saber fazer” o queijo. Os produtores, alguns com histórico familiar de elaboração de outros tipos de queijo, como o frescal, consideram o QMA uma fonte segura de garantirem sua renda e atingirem mercados mais distantes.

A produção do QMA não é atividade exclusiva nas propriedades e se iniciou, em todas, há cerca de 2 anos. Parte de suas produções leiteiras era destinada a laticínios locais. A produção de mel e cachaça e a venda de verduras e outros tipos de queijos, como o tipo parmesão, muçarela e frescal estão entre as demais atividades desenvolvidas por estes produtores.

Todos os produtores realizam a tradicional técnica de elaboração do QMA, com o uso obrigatório de leite cru e soro-fermento, em conformidade com a legislação estadual. A prensagem manual do queijo tem sido realizada, em todas as queijarias, com o auxílio de um tecido sintético, à semelhança do que se vê na região da Serra da Canastra. A mão de obra empregada na elaboração do queijo, em todas as propriedades, é familiar. Em apenas uma, um funcionário da propriedade tem sido treinado na manipulação do QMA. A produção do queijo é diária em quatro propriedades, esporádica em uma e semanal em outra. A produção esporádica em uma das propriedades se explica pelo fato de este produtor não comercializar, ainda, o seu queijo, sob a justificativa de querer colocar seu produto no mercado apenas quando este apresentar alto padrão de qualidade e segurança de consumo. Nas propriedades em que o queijo não era produzido diariamente, o pingo era mantido armazenado em recipiente higienizado, sob refrigeração.

As queijarias eram abastecidas com águas provenientes de nascentes, cisterna ou córrego canalizadas até o reservatório central, no qual eram cloradas em cinco das seis propriedades. Em todas, a cloração era realizada, manualmente, por meio de pastilhas ou aplicação direta do produto na água. O uso de touca durante a produção do queijo era comum a todos os manipuladores. No entanto, o uso de máscara e luvas pelos manipuladores variava entre as queijarias analisadas. Os queijos eram maturados por um período que variava de 2 a 31 dias, em prateleiras de madeira, distribuídos de tal forma que os queijos frescos eram mantidos nas prateleiras inferiores e, conforme o tempo de maturação, eram transferidos para as prateleiras superiores. Com poucas horas de produção dos queijos, cerca de 6 horas, dava-se início ao processo de lavagem dos mesmos com água e, no caso de uma propriedade, com soro de leite. A toaleta era realizada nos queijos que apresentavam irregularidades em suas superfícies sem que houvesse o cuidado de se iniciar o trabalho nos queijos maturados, menos contaminado, seguido dos mais frescos, mais contaminados. Em média, os produtores relataram a utilização de 10L de leite para cada kg de queijo produzido. Os QMA eram por fim, comercializados em comércios locais nas regiões de Carrancas, Tiradentes, Prados e São João del-Rei a preços que variavam de R\$8,00/400g de queijo, a R\$28,00/Kg de queijo.

5.2. Pesquisa de *Staphylococcus coagulase positivo* nos manipuladores de queijo Minas artesanal fresco

A Tabela 7 mostra o resultado da pesquisa de *Staphylococcus coagulase positivo* nos manipuladores de queijo Minas artesanal fresco.

Tabela 7. Resultados da pesquisa de *Staphylococcus* coagulase positivo nas amostras biológicas dos manipuladores de queijo Minas artesanal fresco, segundo o tipo de colônia isolada e resultado no teste de coagulase realizado nas colônias típicas e atípicas crescidas no ágar Baird Parker, e nas colônias amarelas crescidas no ágar Sal Manitol

	Amostras	Ágar Baird Parker			Ágar Sal Manitol	
		Colônia típica	Colônia atípica	Coagulase	Colônias amarelas	Coagulase
Manipulador 1	MD	+	-	positivo	+	positivo
	ME	+	-	positivo	+	positivo
	Orofaringe	+	+	negativo	-	NS
	Narinas	-	+	negativo	-	NS
Manipulador 2	MD	+	+	negativo	-	NS
	ME	+	+	negativo	-	NS
	Orofaringe	+	+	negativo	+	negativo
	Narinas	+	+	negativo	+	negativo
Manipulador 3	MD	+	+	negativo	+	negativo
	ME	+	+	negativo	-	NS
	Orofaringe	-	+	negativo	-	NS
	Narinas	-	+	negativo	-	NS
Manipulador 4	MD	-	+	negativo	+	positivo
	ME	-	+	negativo	+	negativo
	Orofaringe	+	+	negativo	-	NS
	Narinas	-	+	negativo	-	NS
Manipulador 5	MD	-	+	positivo	+	positivo
	ME	-	+	positivo	+	positivo
	Orofaringe	+	+	negativo	-	NS
	Narinas	+	+	negativo	-	NS
Manipulador 6	MD	+	+	negativo	+	negativo
	ME	+	+	negativo	-	NS
	Orofaringe	-	+	negativo	-	NS
	Narinas	+	+	negativo	-	NS
Manipulador 7	MD	-	+	negativo	-	NS
	ME	-	+	negativo	-	NS
	Orofaringe	-	+	negativo	-	NS
	Narinas	+	+	negativo	-	NS

Legenda: + Presença de crescimento; - Ausência de crescimento; MD- Mão Direita; ME- Mão Esquerda
NS Não se aplica (apenas colônias amarelas foram submetidas ao teste de coagulase)

Em todas as placas de ágar BP e ágar sal manitol inoculadas com *swabs* obtidos das mãos, orofaringe e narinas dos manipuladores de QMA houve crescimento sugestivo de *Staphylococcus* spp.. Este crescimento foi confirmado, em seguida, pela realização dos testes de GRAM e catalase nas colônias isoladas, no qual todas apresentaram resultado positivo, em ambos os testes e, à microscopia, estavam organizadas em formas de cacho de uva.

Na prova da coagulase, houve a confirmação de *Staphylococcus* coagulase positivo nas mãos direita e esquerda de dois manipuladores, de colônias obtidas de ambos os meios de cultura utilizados e, apenas, na mão direita de um terceiro manipulador, em colônia isolada a partir de ágar sal manitol. *Staphylococcus* coagulase positivo não foi isolado nas narinas e orofaringe de nenhum dos manipuladores amostrados.

A constatação de que 42,86% dos manipuladores de QMA, das queijarias amostradas, são portadores de *Staphylococcus* coagulase positivo vai ao encontro da estimativa de que 30 a 50% da população humana seja portadora assintomática de *Staphylococcus* coagulase positivo, sendo as fossas nasais, a cavidade oral, pele e pêlo, os locais de predileção do micro-organismo no homem (Stamford *et al.* , 2006).

A maior frequência de colonização de *Staphylococcus* coagulase positivo das mãos dos manipuladores também foi relatada em trabalho realizado em manipuladores de alimento em uma padaria da região central de Goiânia (Martins e Silva, 2009). O contrário foi observado em alguns estudos que relataram frequência maior nas fossas nasais, sendo relatadas médias de 30% a 50% de portadores nas fossas nasais (Vanzo e Azevedo, 2003).

Esta prevalência de 42,86% de manipuladores portadores de *Staphylococcus* coagulase positivo, independente do sítio anatômico, foi semelhante aos 41,67% relatado por Machado *et al.* (2009) e inferior aos 58,3% relatado por Sousa *et al.* (2007), aos 58,2% por Pereira *et al.* (1994) e aos encontrados por Bastos *et al.* de 100% (2002). Por outro lado, foi superior aos 21,06% encontrados por Grandó *et al.* (2008), quando se levou em consideração apenas os manipuladores portadores da bactéria nas mãos.

Staphylococcus aureus, principal representante do grupo de *Staphylococcus* coagulase positivo, é a espécie mais relacionada a casos de intoxicação alimentar devido a capacidade da maioria de suas cepas produzirem enterotoxinas. A ingestão do alimento contaminado, após o período de incubação de uma a seis horas, leva a sintomas clássicos como vômito, diarreia, dores abdominais e prostração. Este quadro é ainda mais grave quando os alimentos são destinados a crianças e idosos, faixas etárias mais acometidas por intoxicações estafilocócicas transmitidas por alimentos.

A presença destes manipuladores portadores de *Staphylococcus* coagulase positivo nas mãos pode levar ao aumento da contagem deste micro-organismo no alimento, uma vez que os queijos artesanais são bastante manipulados durante toda a sua produção, incluindo a maturação. Este contato ocorre tanto na fase de elaboração do QMA, sobretudo, na prensagem manual da massa, quanto ao longo da sua maturação, nas fases de salga, viragem e mudança de prateleira do mesmo, sendo responsável pela transferência direta do micro-organismo ao alimento.

O uso de antimicrobianos no tratamento dos portadores de *Staphylococcus* coagulase positivo é controverso, devido as altas taxas de recolonização e aparecimento de cepas multi resistentes a antimicrobianos (Figueró *et al.* , 2002). Por isso, a aplicação de boas práticas de fabricação

dentro da queijaria é de grande importância na prevenção da contaminação do produto final. Uma vez cientes do risco da manipulação inadequada do QMA, os manipuladores portadores de *Staphylococcus* coagulase positivo devem ser mais rigorosos quanto a tomada de medidas higiênicas dentro das queijarias, como a limpeza e higienização adequada das mãos, com o uso de produtos próprios para estes fins, e até mesmo, a adoção do uso de luvas, toucas e máscaras durante a manipulação dos queijos.

Algumas colônias amarelas isoladas das placas de ágar sal manitol, sugestivas de *Staphylococcus* coagulase positivo, foram negativas à prova de coagulase, como visto na tabela 6. Estes micro-organismos são capazes de fermentar o manitol diante de um meio de alta concentração de NaCl. A degradação do manitol com a produção de ácido é a responsável pela mudança de cor do meio, de rosado para amarelo. Apesar da fermentação de manitol ser utilizada como critério de identificação presuntiva de *Staphylococcus* coagulase positivo, outras espécies de *Staphylococcus* coagulase negativo podem também apresentar o caráter positivo de fermentação do manitol, como, por exemplo, *S.epidermidis*, *S. haemolyticus* e *S. saprophyticus* (Von Eiff *et al.* , 2001; Koneman *et al.* , 2005; Schuenck *et al.* , 2008).

Embora na legislação estadual do QMA haja valor máximo de contagem apenas para *Staphylococcus* coagulase positivo, sabe-se que algumas cepas coagulase negativo também podem produzir enterotoxinas (Carmo *et al.* , 2002). Desta forma, a colonização por *Staphylococcus* spp. em todos os sítios anatômicos pesquisados dos manipuladores é relevante e exige medidas adicionais higiênicas para o seu controle.

5.3. Qualidade microbiológica e físico-química da água

Não houve diferença ($p>0,05$) na comparação do Número Mais Provável de coliformes a 30°C e a 45°C e da contagem de bactérias ácido-láticas nas amostras de água entre os dois períodos do ano avaliados. Entretanto, a mediana da contagem de mesófilos aeróbios no período da chuva foi superior ($p<0,05$) a encontrada no período da seca (tabela 8).

Tabela 8. Médias, coeficientes de variação (CV), medianas, valores mínimo e máximo dos resultados de parâmetros microbiológicos de qualidade de água de queijarias de produtores não cadastrados na região de Campo das Vertentes – MG

Parâmetros microbiológicos	Período	Média	CV(%)	Mediana	Mínimo	Máximo
Coliformes 30°C (NMP/100mL)	Seca	43	227,66	<3	<3	240
	Chuva	186	240,99	<3	<3	>1100
Coliformes 45°C (NMP/100mL)	Seca	4	62,76	<3	<3	9,2
	Chuva	186	240,99	<3	<3	>1100
Mesófilos aeróbios (UFC/mL)	Seca	6x10 ¹	173,75	<1 ^b	<1	2,6x10 ²
	Chuva	5,3x10 ²	209,41	1x10 ^{1a}	<1	2,8x10 ³
BAL MRS (UFC/mL)	Seca	3x10 ¹	147,57	<1x10 ¹	<1x10 ¹	1,2x10 ²
	Chuva	1,7x10 ¹	97,98	<1x10 ¹	<1x10 ¹	5x10 ¹
BAL M17 (UFC/mL)	Seca	8,2x10 ²	194,21	4,5x10 ¹	<1x10 ¹	4x10 ³
	Chuva	1,5x10 ²	228,06	<1x10 ¹	<1x10 ¹	8,2x10 ²

Medianas seguidas por letras distintas na coluna diferem pelo teste de Friedman ($p < 0,05$).

As medianas encontradas para Número Mais Provável de coliformes a 30°C e a 45°C, tanto no período da seca quanto na chuva, indicam que 50% das propriedades apresentaram valores <3NMP/100mL. Pela limitação da técnica utilizada, estes valores podem ser interpretados como a ausência de detecção destes micro-organismos na água potável, em concordância com o exigido pelas legislações vigentes.

Todos os proprietários realizavam a cloração da água de abastecimento das queijarias, a exceção de um, sendo esta propriedade a responsável pelos valores máximos, fora dos preconizados pela legislação, para Número Mais Provável de coliformes a 30°C e a 45°C de, respectivamente, 240 NMP/100mL e 9,2NMP/100mL, no período da seca e de >1000 NMP/mL, para os dois parâmetros, no período da chuva. A presença de coliformes a 30°C e 45°C em altas concentrações na água de abastecimento, nesta propriedade, representa uma importante fonte de contaminação no interior da queijaria, à medida que esta água é usada nos procedimentos de sanitização das mãos do manipulador, higienização dos utensílios e, ainda, na lavagem dos queijos. Desta forma, o risco de contaminação do leite, do soro-fermento e conseqüentemente, do queijo é existente.

A água contaminada por coliformes a 30°C e a 45°C pode tanto promover a deterioração do alimento como causar enfermidade na população consumidora. Um dos principais defeitos observados no queijo causado pela presença deste grupo de micro-organismos é o estufamento precoce, responsável por perdas das características sensoriais do produto e rejeição por parte do consumidor (Furtado, 1991).

Borelli *et al.* (2006a), ao analisaram a qualidade microbiológica da água utilizada na elaboração do queijo Minas artesanal da região da Serra da Canastra, encontraram contagens iguais ou superiores a 16 NMP/100mL de coliformes a 30°C e contagens entre 2,2 NMP/100mL e >16 NMP/100mL de *Escherichia coli*, de forma semelhante aos resultados deste presente trabalho. A não conformidade destes parâmetros com a legislação em águas usadas em queijarias artesanais também foi relatada em trabalhos realizados nas regiões de Campo das Vertentes, Araxá e Serro (Araújo, 2004; Martins, 2006; Oliveira, 2014).

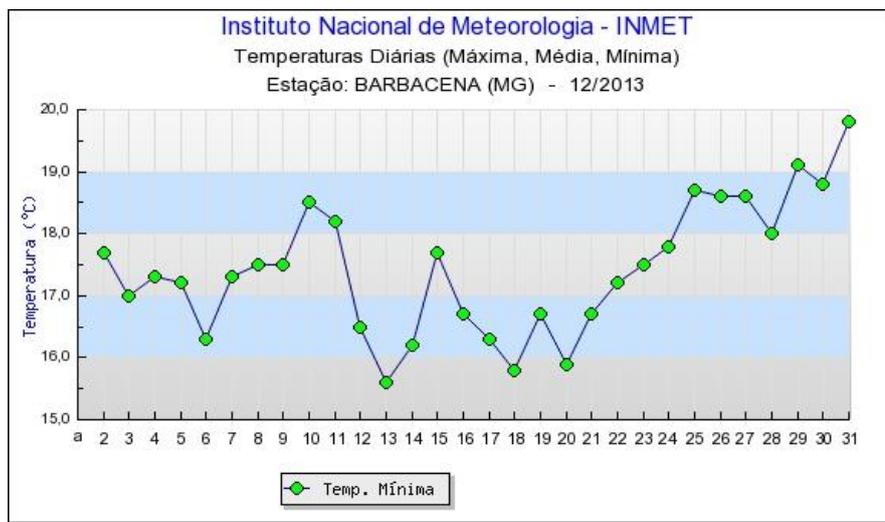
Bactérias ácido-láticas foram encontradas, ainda que em baixas contagens, na água de abastecimento das queijarias, confirmando que a água também pode ser veículo de bactérias ácido-láticas para o QMA, sendo assim, fonte de micro-organismos desejáveis ao produto (Ortali, 2009). Os valores médios encontrados de 3×10^1 UFC/mL e $1,7 \times 10^1$ UFC/mL, no meio MRS, e de $8,2 \times 10^2$ UFC/mL e $1,5 \times 10^2$ UFC/mL no meio M17, nos períodos de seca e chuva, respectivamente, foram superiores ao relatados em pesquisa na mesma região, em propriedades cadastradas ao IMA, em que as contagens de bactérias ácido-láticas no meio MRS, foram de <1UFC/mL e 5 UFC/mL, enquanto que, no meio M17, foram de 4 UFC/mL e <10 UFC/mL, na seca e na chuva, respectivamente (Oliveira, 2014).

A contagem de mesófilos aeróbios na água das queijarias no período da seca foi inferior a do período da chuva ($p < 0,05$). Ainda que altos, o valor máximo de contagem encontrado no período seco, de $2,6 \times 10^2$ UFC/mL, e o valor médio de 6×10^1 UFC/mL estavam dentro do preconizado pela legislação estadual, de forma que a água de todas as queijarias estaria conforme neste quesito microbiológico, nesta época do ano. O mesmo não foi observado no período da chuva, em que o valor máximo de $2,8 \times 10^3$ UFC/mL e o valor médio de $5,3 \times 10^2$ UFC/mL encontrados nas águas das queijarias estavam acima do permitido pela legislação (Brasil, 2012b).

Resultados semelhantes, com altas contagens em placas de micro-organismos mesófilos aeróbios, no período da chuva, também foram encontrados em água de queijarias cadastradas no IMA, na região de Campo das Vertentes (Oliveira, 2014).

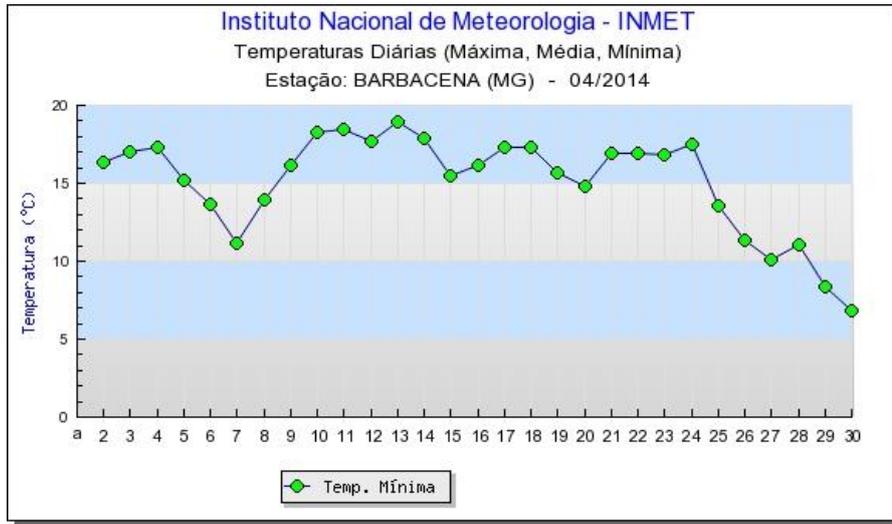
A propriedade que contribuiu para a elevação das contagens médias de mesófilos aeróbios na água foi a mesma que não realizava a cloração das águas, nos períodos estudados. Na chuva, esta contaminação da água de abastecimento foi agravada pela temperatura e umidade altas observadas na região, além do maior aporte de matéria orgânica do solo até os cursos de água, esperado neste período.

De fato, os períodos correspondentes a elaboração dos queijos no período da chuva, dias 15 e 16 de dezembro de 2013 e dias 15 e 16 de abril de 2014, apresentaram temperaturas mínimas mais altas de, aproximadamente, 17,5°C (Figura 4) e 16°C (Figura 5), respectivamente, se comparadas com a temperatura mínima registrada de, aproximadamente 10°C, no dias 22 e 23 de julho de 2014 (Figura 7), época das coletas no período de seca. Da mesma forma, o índice pluviométrico mensal e o número de dias com chuva nos meses de coleta do período chuvoso foram superiores aos mesmos parâmetros registrados no mês das coletas no período de seca, segundo dados do Instituto Nacional de Meteorologia (INMET), vinculado ao MAPA (Figuras 6 e 8). Não houve o registro, no INMET, das temperaturas máximas e médias da região nos períodos avaliados.



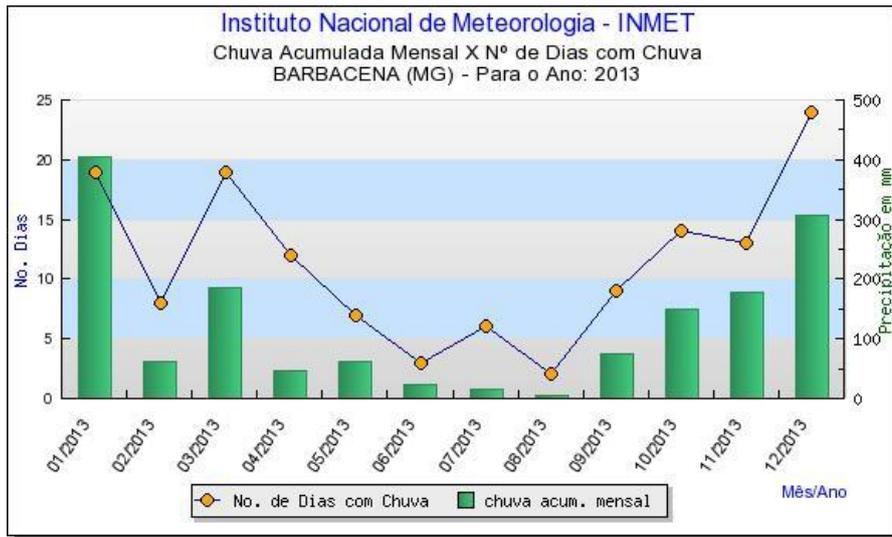
Fonte: Temperaturas...2013

Figura 4. Temperatura diária mínima para o mês de dezembro de 2013 da estação de Barbacena, Campo das Vertentes – MG.



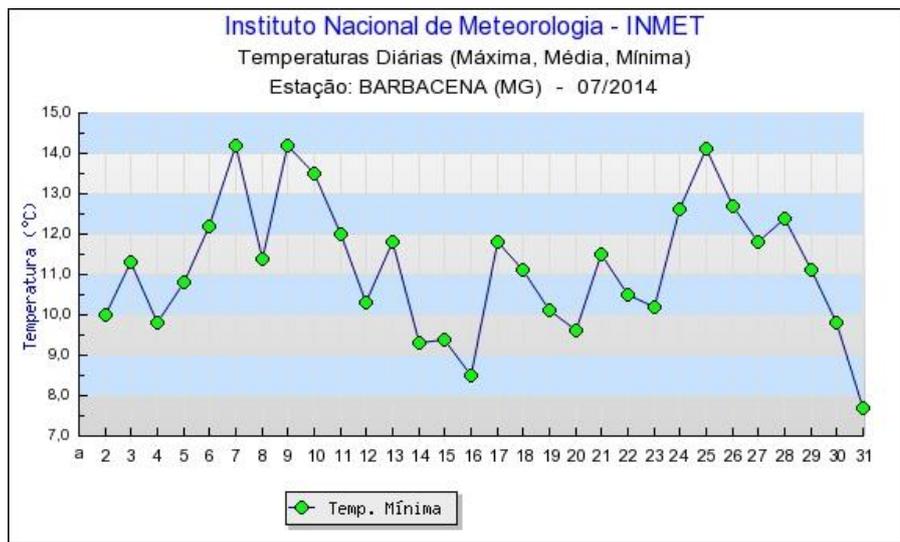
Fonte: Temperaturas...2014a

Figura 5. Temperatura diária mínima para o mês de abril de 2014 da estação de Barbacena, Campo das Vertentes – MG.



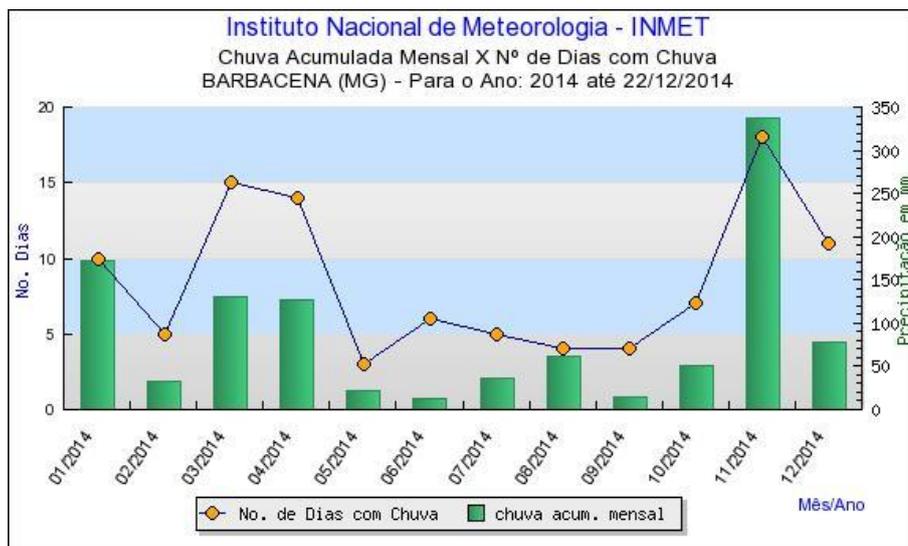
Fonte: Chuva...2013

Figura 6. Chuva acumulada mensal e número de dias com chuva para o ano de 2013 da estação de Barbacena, Campo das Vertentes – MG.



Fonte: Temperaturas...2014b

Figura 7. Temperatura diária mínima para o mês de julho de 2014 da estação de Barbacena, Campo das Vertentes – MG.



Fonte: Chuva...2014

Figura 8. Chuva acumulada mensal e número de dias com chuva para o ano de 2014 da estação de Barbacena, Campo das Vertentes – MG.

Em relação às propriedades físico-químicas da água das queijarias não cadastradas de Campo das Vertentes, houve diferença na comparação do pH e cloro residual, entre os períodos de seca e chuva ($p < 0,05$). Entretanto, esta diferença não foi observada quando se avaliou a dureza da água ($p > 0,05$) (tabela 9).

Tabela 9. Médias, coeficientes de variação (CV), medianas, valores mínimo e máximo dos resultados de parâmetros físico- químicos de qualidade de água de queijarias de produtores não cadastrados na região de Campo das Vertentes – MG

Parâmetros físico-químicos	Período	Média	CV(%)	Mediana	Mínimo	Máximo
Dureza (mg/L)	Seca	12,78	84,38	10,8	1,5	28,6
	Chuva	7,83	65,8	6	4	18
pH	Seca	7,06 ^a	2,57	7,12	6,82	7,28
	Chuva	6,05 ^b	10,13	6,09	5,3	6,76
Cloro Residual (ppm)	Seca	4,43	65,53	6,03 ^a	0,71	6,74
	Chuva	2,66	72,91	2,84 ^b	0,35	5,32

Medianas seguidas por letras distintas na coluna diferem pelo teste de Friedman ($p < 0,05$).

Médias seguidas por letras distintas na coluna diferem pelo teste F ($p < 0,05$).

O monitoramento do pH é um importante indicador sobre a qualidade da água. De acordo com a Portaria do Ministério da Saúde n. 2.914, de 12 de dezembro de 2011, o pH da água deve estar entre 6,0 e 9,5 (Brasil, 2012b). Embora diferentes ($p < 0,05$), os valores médios de pH encontrados no período de chuva e seca, de 6,05 e 7,06, respectivamente, estavam dentro da faixa exigida pela legislação vigente, determinando eficiência nos procedimentos de limpeza e desinfecção a partir do uso desta água.

No período da chuva, o valor mínimo encontrado de pH igual a 5,3 indica que algumas queijarias apresentaram valores de pH da água inferiores ao exigido pela legislação. Baixos valores de pH, além de afetarem os processos de limpeza, podem contribuir para o aumento da corrosividade da água utilizada dentro da queijaria, reduzindo, sobretudo, a vida útil dos equipamentos (Santos, 2011). O menor valor médio de pH ($p < 0,05$) observado, neste período, pode estar associado a maior concentração de CO_2 dissolvido na água da queijaria. Isso ocorre em virtude da elevada taxa de decomposição da matéria orgânica, comumente, encontrada em maiores quantidades na água no período da chuva.

Valor mínimo de pH da água, fora do preconizado pela legislação e valor máximo dentro do desejado, também, foram relatados em estudo realizado em queijarias artesanais da região de Araxá, no qual os valores de pH encontrados na água de abastecimento variaram entre 4,91 e 7,8, sendo a média igual a 6,62 (Araújo, 2004).

A dureza indica a concentração de cátions bivalentes dissolvidos, em especial os de cálcio (Ca^{+2}) e magnésio (Mg^{+2}), na água. Quando presentes em grandes concentrações, estes cátions, em presença de detergente alcalino, se precipitam e levam às formações de incrustações nas superfícies de contato da queijaria, acarretando perda da qualidade do produto final, com a formação de biofilmes pelo crescimento de bactérias. Toxinas e enzimas produzidas pelas colônias do biofilme podem ser incorporadas ao queijo tornando-o impróprio para o consumo, além de diminuir o seu tempo de prateleira (Picinin *et al.* , 2001).

O Ministério da Saúde determina que a água utilizada para consumo humano tenha dureza de, no máximo, 500 mg/L de CaCO_3 (Brasil, 2012b). A dureza da água, no período seco, variou de 1,5 mg/L de CaCO_3 a 28,6 mg/L de CaCO_3 , enquanto que no período da chuva estes valores foram de 4 mg/L de CaCO_3 a 18 mg/L de CaCO_3 . Embora não haja uma convenção formal, a água de ambos os períodos pode ser classificada como muito mole e adequada para os procedimentos de limpeza e higienização das queijarias, segundo Von Sperling (2005).

Embora a dureza e o valor médio de pH na água de abastecimento das queijarias estivessem dentro do desejado para água potável, ainda observaram-se irregularidades quanto a sua qualidade microbiológica. De forma semelhante, Picinin *et al.* (2001), ao analisarem a qualidade do leite e da água de 31 propriedades do estado de Minas Gerais, observaram que embora a dureza e o pH da água estivessem adequados, a qualidade microbiológica em 80,17% das amostras era insatisfatória.

A concentração de cloro residual encontrado na água no período da seca foi superior a encontrada no período das águas ($p < 0,05$). Esta diferença pode ter ocorrido pelo fato de grande parte dos proprietários realizarem a cloração manual da água, diretamente no reservatório da queijaria, sem qualquer conhecimento a cerca da vazão da água no recipiente. Desta forma, no período seco, a adição da mesma quantidade de cloro em um reservatório de menor vazão de água, causada pela escassez de chuvas, poderia ser o motivo para a maior concentração de cloro observada neste período.

Segundo a legislação estadual de queijo Minas artesanal, a água usada no interior da queijaria deve estar a uma concentração de 2ppm a 3ppm de cloro (Minas Gerais, 2002b). O cloro, por meio de oxidação, é um dos principais compostos químicos utilizados na inativação de micro-organismos nas águas de estabelecimentos alimentícios, embora possua baixa ação na inativação de cistos e oocistos de protozoários e ovos de helmintos (WHO, 2011). Sua eficiência de ação é influenciada pela sua concentração, tempo de contato com a água, pH e dureza do meio, tipo e concentração de micro-organismos na água e dispersão do produto do reservatório (Meyer, 1994).

No período de seca, 50% das amostras apresentaram valor de cloro igual ou superior a 6,03. Este alto valor de cloro é indesejado em estabelecimentos de alimentos, por proporcionar odor e sabor desagradáveis ao produto final, além de ser prejudicial à saúde do consumidor, pelas propriedades lesivas do cloro. Por outro lado, os valores mínimos de cloro na água encontrados no período de seca e chuva de 0,75 ppm de Cl_2 e 0,35 ppm de Cl_2 , respectivamente, refletem a ineficiência do processo de cloração em algumas das queijarias amostradas e, conseqüentemente, nos procedimentos de limpeza e higienização realizados no interior das mesmas.

5.4. Qualidade microbiológica do soro-fermento

Não houve diferença entre as medianas do Número Mais Provável de coliformes a 30°C e entre as contagens de *Staphylococcus* spp., bolores e leveduras e bactérias ácido-láticas nos períodos avaliados ($p > 0,05$). Por outro lado, foram observadas maiores contagens medianas de *Staphylococcus* coagulase positivo e maior Número Mais Provável de coliformes a 45°C no soro-fermento de queijo elaborado no período da chuva ($p < 0,05$). *Salmonella* spp. não foi detectada nos períodos avaliados (tabela 10).

Tabela 10. Médias, coeficientes de variação (CV), medianas, valores mínimo e máximo dos resultados de parâmetros microbiológicos de qualidade de soro-fermento de queijarias de produtores não cadastrados na região de Campo das Vertentes – MG

Parâmetros microbiológicos	Período	Média	CV(%)	Mediana	Mínimo	Máximo
Coliformes 30°C (NMP/mL)	Seca	742	75,95	730	120	1500
	Chuva	6766	71,79	7800	93	>11000
Coliformes 45°C (NMP/mL)	Seca	3,2	9,68	<3 ^b	<3	3,6
	Chuva	2854	145,9	1520 ^a	93	>11000
<i>Staphylococcus coagulase positivo</i> (UFC/mL)	Seca	<1x10 ³	0	<1x10 ^{3b}	<1x10 ³	<1x10 ³
	Chuva	2,4x10 ⁵	182,47	1,8x10 ^{4a}	<1x10 ³	1,1x10 ⁶
<i>Staphylococcus spp.</i> (UFC/mL)	Seca	3,5x10 ⁴	109,18	2x10 ⁴	< 1x10 ³	1x10 ⁵
	Chuva	2,1x10 ⁶	135,54	8,5x10 ⁵	<1x10 ³	7,1x10 ⁶
Bolores e leveduras(UFC/mL)	Seca	9,6x10 ⁵	69,03	1,2x10 ⁶	<1x10 ²	1,5x10 ⁶
	Chuva	5,1x10 ⁵	207,5	5,2x10 ²	<1x10 ²	2,6x10 ⁶
BAL MRS (UFC/mL)	Seca	3,6x10 ⁷	147,96	1,3x10 ⁷	3,3x10 ⁵	1,4x10 ⁸
	Chuva	9x10 ⁷	139,88	1,6x10 ⁷	1,5x10 ⁶	2,6x10 ⁸
BAL M17 (UFC/mL)	Seca	6,5x10 ⁷	136,49	2,2x10 ⁷	3,3x10 ⁵	2,2x10 ⁸
	Chuva	2,3x10 ⁸	136,77	6,5x10 ⁷	1,1x10 ⁶	7,2x10 ⁸
<i>Salmonella spp.</i> (25mL)	Seca			Ausência		
	Chuva			Ausência		

Medianas seguidas por letras distintas na coluna diferem pelo teste de Friedman (p < 0,05)

Embora não haja legislação específica para a determinação dos parâmetros microbiológicos aceitáveis no soro-fermento, foi possível constatar altas contagens de todos os micro-organismos pesquisados no mesmo. A presença de contagens elevadas de bactérias do grupo coliformes, *Staphylococcus spp.* e bolores e leveduras no pingo representa uma fonte de contaminação direta ao queijo Minas artesanal, desta forma, sendo responsável pela perda de qualidade microbiológica do produto final. Por outro lado, as altas contagens de bactérias ácido-láticas encontradas no soro-fermento seriam responsáveis pela proteção intrínseca deste aos patógenos ali presentes, além de contribuírem para as características sensoriais do QMA.

Dentre os micro-organismos deteriorantes no soro-fermento, encontram-se os coliformes a 30°C. Uma vez presentes em altas contagens, como demonstrado na tabela 10, levam a deterioração rápida do meio, devido a presença de ácidos e gases oriundos do processo de fermentação da lactose. Borelli *et al.* (2006a) encontraram em trabalho realizado em soro fermento da região da Serra da Canastra contagens de coliformes a 30°C variando de 93 a >1100 NMP/mL, à semelhança do visto neste estudo. Por outro lado, os coliformes a 45°C, representados, principalmente por *Escherichia coli*, expressam alto potencial de patogenicidade quando presentes em altas concentrações no meio. No período da seca, foram encontrados baixos valores de Número Mais Provável de coliformes a 45°C no soro-fermento das queijarias, variando de <3 NMP/mL a 3,6 NMP/mL, determinando pingos pouco contaminados quanto a estes micro-organismos. Contrariamente, no período da chuva 50% das propriedades apresentaram Número Mais Provável de coliformes termotolerantes igual ou superior a 1500 NMP/mL, sendo que, em algumas queijarias foram observados valores de >11.000 NMP/mL. A maior contagem mediana destas bactérias no período chuvoso se explica pelas condições de alta

temperatura e umidade nesta época do ano, favoráveis ao desenvolvimento e multiplicação bacteriana, uma vez que coletado de um dia para outro, o soro-fermento permanece à temperatura ambiente até o momento da sua utilização. Adicionalmente, deficiências no processo de higienização dos utensílios na queijaria, neste período, e a quantidade de sal utilizada durante a salga podem também ter sido responsáveis por contagens mais elevadas destes micro-organismos, no período da chuva.

As medianas da contagem de *Staphylococcus* spp. no soro-fermento indicam que 50% das amostras apresentaram contagens iguais ou superiores a 2×10^4 UFC/mL e 8×10^5 UFC/mL nos períodos da seca e chuva, respectivamente. Apesar de relatos na literatura considerarem a produção de enterotoxinas a partir de 10^5 UFC/mL, dados apresentados no trabalho realizado por Veras (2004) confirmam a possibilidade de produção de enterotoxinas em contagens de 10^2 a 10^3 UFC/mL, o que ratifica o risco das altas contagens encontradas no soro-fermento. A ausência de diferença na avaliação deste micro-organismo entre os dois períodos do ano, embora em contagens inferiores aos presentes na tabela 10, foi relatada em trabalho realizado com pingo da região da Serra da Canastra (Dores *et al.*., 2013). Por outro lado, foram observadas contagens altas de *Staphylococcus* coagulase positivo no soro-fermento avaliado somente no período da chuva, sendo o valor mediano obtido superior ao valor mediano do período da seca ($p < 0,05$), quando não houve a detecção de *Staphylococcus* coagulase positivo. No período da chuva, a maior concentração deste patógeno pode ocorrer pelos mesmos motivos já citados, anteriormente, para bactérias do grupo coliforme, somados à manipulação inadequada do soro-fermento, tendo em vista que 30 a 50% da população humana seja portadora assintomática de *Staphylococcus* coagulase positivo e à maior ocorrência de mastite no rebanho (Stamford *et al.*, 2006, Zafalon *et al.*., 2009).

Contagens de bolores e leveduras semelhantes às encontradas na presente pesquisa foram relatadas em fermento endógeno para produção de queijo Minas artesanal da Serra do Salitre, em que os valores variaram de 3×10^1 UFC/mL a $2,7 \times 10^5$ UFC/mL (Lima *et al.*., 2009). A ausência de diferença observada entre os períodos do ano para este parâmetro, também foi documentada por Oliveira (2014), ao analisar o pingo usado na elaboração de queijo Minas artesanal de Campos das Vertentes, em propriedades cadastradas ao IMA. As contagens médias de bolores e leveduras foram de $4,6 \times 10^5$ UFC/mL, no período da seca, e de $1,1 \times 10^6$ UFC/mL no período das águas.

Em relação às bactérias ácido-láticas, não houve diferença entre as contagens medianas dos períodos analisados ($p > 0,05$). Resultado semelhante foi relatado em pesquisa de BAL em soro-fermento de queijo Minas artesanal da Serra da Canastra, em que as medianas das contagens de $3,5 \times 10^5$ UFC/mL e $1,2 \times 10^7$ UFC/mL, nos períodos de seca e chuva, respectivamente, também não foram diferentes ($p > 0,05$) (Nóbrega, 2007).

Foram encontrados elevados valores mínimos e máximos de contagem de BAL nos meios MRS e M17, respectivamente, nas bases de 10^5 e 10^8 no período da seca, e de 10^6 e 10^8 no período da chuva, ficando evidente que esse grupo compõe a microbiota dominante do soro-fermento desta região. Altas contagens mínimas e máximas de BAL, $6,5 \times 10^6$ UFC/mL e $3,3 \times 10^7$ UFC/mL, respectivamente, também foram relatadas em pingo utilizado na elaboração de QMA do Serro (Santos, 2010).

A presença, em altas proporções, de BAL no soro-fermento é desejada ao processo de elaboração do QMA, pelo fato destes micro-organismos, além de proporcionarem grande parte

das características sensoriais típicas do QMA, serem responsáveis pela redução da contagem de patógenos no produto. Isso ocorre pela competição direta por nutrientes no alimento e, sobretudo, pela produção de ácidos, bacteriocinas, entre outros compostos antagonistas a alguns patógenos de importância alimentar, como *Salmonella* spp., *Listeria* spp. e *Staphylococcus* spp. (Perin *et al.* , 2012). A ausência de *Salmonella* spp. nos soros-fermento analisados pode estar associada a esta atividade antagonista desempenhada pelas BAL.

5.5. Qualidade microbiológica e físico-química do leite cru

Não houve diferença ($p > 0,05$) entre as médias das contagens de células somáticas e as medianas das contagens bacteriana totais nos leites coletados nos períodos de seca e chuva (tabela 11).

Tabela 11. Médias, coeficientes de variação (CV), medianas, valores mínimo e máximo dos resultados de Contagem de Células Somáticas (CCS) e Contagem Bacteriana Total (CBT) de leite cru obtido em queijarias de produtores não cadastrados na região de Campo das Vertentes – MG

Parâmetros	Período	Média	CV(%)	Mediana	Mínimo	Máximo
CCS (células/mL)	Seca	$2,4 \times 10^5$	55,22	$2,4 \times 10^5$	$1,8 \times 10^4$	$3,9 \times 10^5$
	Chuva	$2,5 \times 10^5$	58,81	$2,5 \times 10^5$	5×10^4	$4,8 \times 10^5$
CBT (UFC/mL)	Seca	$9,7 \times 10^5$	234,4	$2,9 \times 10^4$	6×10^3	$5,6 \times 10^6$
	Chuva	$3,3 \times 10^6$	84,89	$4,1 \times 10^6$	2×10^3	$5,6 \times 10^6$

Os valores médios de CCS, nos períodos de seca e de chuva, estavam dentro do preconizado pela legislação (Minas Gerais, 2002b). Apenas uma propriedade, responsável pelo valor máximo de CCS de $4,8 \times 10^5$ CCS/mL no período de chuva estava em desacordo com a mesma. A CCS no leite de um animal pode ser influenciada pelo estado nutricional, estágio de lactação, idade, estresse, além do tipo de patógeno envolvido. Contudo, a maior fonte de variação celular do leite são as Infecções Intramamárias (IIM), uma vez que a migração dos leucócitos do leito vascular para o leite depende da liberação de citocinas pró-inflamatórias que ocorrem durante as mastites (Harmon, 1994).

De forma geral, as propriedades realizavam, como rotina de ordenha, o teste da caneca de fundo telado na detecção da mastite clínica e o tratamento imediato das vacas constatadas doentes. Além disso, realizavam o tratamento de vaca seca com antimicrobiano adequado, com o objetivo de prevenir novas infecções intramamárias e eliminar as infecções subclínicas existentes nos animais. Adicionalmente, os produtores praticavam a eliminação de animais velhos e cronicamente infectados do rebanho, linha de ordenha e *pré* e *pós dipping* adequados. Tais medidas corretivas e preventivas determinaram a CCS do leite dentro do preconizado pela legislação (Minas Gerais, 2002b), de no máximo 4×10^5 CCS/mL, em ambos os períodos estudados, e, conseqüentemente, melhor composição, rendimento e qualidade de seus derivados.

Embora a rotina de ordenha, quanto ao manejo dos animais, fosse adequada nas propriedades, observou-se um grande número de falhas quanto a limpeza e higienização dos equipamentos de ordenha. Em nenhuma das propriedades era seguido o binômio tempo/temperatura de aplicação do detergente alcalino clorado necessário para a eficiência de remoção de proteínas e gordura dos equipamentos. Além disso, em poucas propriedades o detergente ácido era utilizado como agente de remoção de resíduos minerais ou era realizada a correta manutenção do equipamento

de ordenha, como troca das teteiras periodicamente. Como fator mais agravante, 50% das propriedades não realizavam a sanitização da ordenhadeira antes do início da ordenha, sendo esta etapa a mais relevante para a redução da contagem bacteriana do leite (Santos e Fonseca, 2007). Diante deste quadro de deficiência nos processos de higienização dos equipamentos de ordenha, puderam ser observadas altas contagens bacterianas nos leites analisados, em ambos os períodos. Na maioria das fazendas, estes valores estavam acima do preconizado pela legislação (Minas Gerais, 2002b), de, no máximo, 1×10^5 UFC/mL, como evidenciam as medianas obtidas, principalmente, do leite coletado na chuva.

Resultados semelhantes foram descritos por Oliveira (2014), ao avaliar o leite cru usado na elaboração de queijo Minas artesanal de Campo das Vertentes, em que não houve diferença ($p > 0,05$) nos valores de CCS e CBT entre os períodos avaliados. As médias foram de $3,9 \times 10^5$ CCS/mL no período seco e $8,9 \times 10^5$ CCS/mL no período chuvoso e de $7,7 \times 10^5$ UFC/mL no período seco, e $4,3 \times 10^5$ UFC/mL no período chuvoso. De forma semelhante, não foi observada diferença ($p > 0,05$) na CBT média de leite cru utilizado na elaboração de queijo Serrano, que foi de $1,2 \times 10^6$ UFC/mL, no verão, e de 5×10^5 UFC/mL, no inverno (Souza *et al.*, 2003).

Os resultados microbiológicos de leite cru encontram-se na tabela 12. Nos parâmetros avaliados, contagens de *Staphylococcus* spp., *Staphylococcus* coagulase positivo, bolores e leveduras e bactérias ácido-láticas em leite cru, não houve diferença ($p > 0,05$) das medianas na comparação entre os períodos de seca e chuva. Já para o Número Mais Provável de coliformes a 30°C e a 45°C, as medianas foram superiores no período de chuva ($p < 0,05$).

Tabela 12. Médias, coeficientes de variação (CV), medianas, valores mínimo e máximo dos resultados de parâmetros microbiológicos de qualidade de leite cru de queijarias de produtores não cadastrados na região de Campo das Vertentes – MG

Parâmetros microbiológicos	Período	Média	CV(%)	Mediana	Mínimo	Máximo
Coliformes 30°C (NMP/mL)	Seca	61	145,91	39,5 ^b	<3	240
	Chuva	3742	150,29	195 ^a	23	>11000
Coliformes 45°C (NMP/mL)	Seca	9	136,66	3 ^b	<3	35
	Chuva	81	181,8	32 ^a	<3	380
<i>Staphylococcus</i> coagulase positivo (UFC/mL)	Seca	$7,8 \times 10^3$	123,99	$3,1 \times 10^3$	$<1 \times 10^3$	$2,5 \times 10^4$
	Chuva	$7,1 \times 10^3$	208,13	1×10^3	$<1 \times 10^3$	$3,7 \times 10^4$
<i>Staphylococcus</i> spp. (UFC/mL)	Seca	$2,5 \times 10^4$	195,77	$2,9 \times 10^3$	$<1 \times 10^3$	$1,3 \times 10^5$
	Chuva	$3,9 \times 10^5$	198,9	$7,4 \times 10^4$	$<1 \times 10^3$	2×10^6
Bolores e leveduras (UFC/mL)	Seca	$5,5 \times 10^5$	229,53	$2,1 \times 10^4$	$<1 \times 10^2$	$3,1 \times 10^6$
	Chuva	$1,6 \times 10^4$	184,01	$2,7 \times 10^3$	$<1 \times 10^2$	$7,3 \times 10^4$
BAL MRS (UFC/mL)	Seca	$4,4 \times 10^6$	244,64	$4,2 \times 10^3$	$<1 \times 10^3$	$2,6 \times 10^7$
	Chuva	4×10^6	192,32	1×10^6	$1,7 \times 10^4$	2×10^7
BAL M17 (UFC/mL)	Seca	$3,4 \times 10^6$	240,73	$3,2 \times 10^4$	$<1 \times 10^3$	2×10^7
	Chuva	$7,3 \times 10^6$	219,65	$3,3 \times 10^5$	$1,8 \times 10^4$	4×10^7
<i>Salmonella</i> spp. (25 mL)	Seca			Ausência		
	Chuva			Ausência		

Medianas seguidas por letras distintas na coluna diferem pelo teste de Friedman ($p < 0,05$).

As maiores contagens medianas de coliformes a 30°C e a 45°C, no período da chuva, são explicadas pela elevada temperatura e umidade do ar neste período (figuras 4 a 8), que favorecem a multiplicação deste grupo de bactérias, primordialmente ambientais, no leite. Além disso, também são reflexos da incorreta higienização dos equipamentos de ordenha e do ambiente dos animais e de possível contaminação fecal durante e após a ordenha, no transporte do leite até a queijaria e dentro dela. Outra explicação para a elevada contagem de coliformes no leite seria a ocorrência de mastite ambiental nas vacas, que é caracterizada pelo aumento do número de casos clínicos no rebanho, sem causar alterações significativas na CCS do leite de tanque, como observado na tabela 11 (Tomazi, 2013).

Embora seja evidente nas propriedades pesquisadas a tomada de algumas medidas de controle para a redução da presença de *Staphylococcus* spp. no leite, como *pré* e *pós dipping*, linha de ordenha, tratamento de vaca seca e descarte de animais cronicamente infectados, as contagens de *Staphylococcus* spp. e *Staphylococcus* coagulase positivo foram altas em ambos os períodos avaliados. As medianas das contagens de *Staphylococcus* coagulase positivo de 1×10^3 UFC/mL e $3,1 \times 10^3$ UFC/mL, na chuva e seca, respectivamente, indicaram inadequação dos valores em relação a legislação estadual (Minas Gerais, 2002b). Desta forma, ficam evidentes outros reservatórios destes agentes dentro do sistema de produção, permitindo novas infecções, por exemplo, lesões de pele e tetos das vacas, as mãos dos ordenhadores e presença de teteiras contaminadas.

Resultados semelhantes foram encontrados em pesquisa de leite cru usado na elaboração de QMA do Serro, no qual *Staphylococcus aureus* foi encontrado em altas contagens nos períodos seco e chuvoso, sem diferença ($p > 0,05$) entre os períodos avaliados. Nas águas, a contagem média deste micro-organismo foi de $2,8 \times 10^3$ UFC/mL e na seca, de $2,7 \times 10^4$ UFC/mL (Martins, 2006).

A contagem de bactérias ácido-láticas no leite foi elevada, em ambos os períodos avaliados. Esse fato é desejável para a produção de queijo Minas artesanal do Campo das Vertentes, uma vez que elas são responsáveis por grande parte das características sensoriais do produto, além de provavelmente antagonizarem bactérias patogênicas no mesmo. Em pesquisa com leite cru usado na elaboração do queijo Zlatar, produto artesanal da Eslováquia, contagem de bactérias ácido-láticas apresentou valores médios de $3,2 \times 10^5$ UFC/mL no meio MRS e de 7×10^5 UFC/mL no meio M17, à semelhança do encontrado neste presente trabalho (Veljovic *et al.*, 2007).

Em pesquisa realizada na região de Campo das Vertentes, em propriedades cadastradas no IMA, a contagem média de BAL no leite cru no período da seca foi de $1,7 \times 10^5$ UFC/mL e $2,4 \times 10^6$ UFC/mL nos ágaros MRS e M17, respectivamente, e de 5×10^4 UFC/mL e $3,5 \times 10^6$ UFC/mL, no período das chuvas, respectivamente (Oliveira, 2014).

Apesar da inexistência de padrão microbiológico para a enumeração de bolores e leveduras, foram encontradas neste estudo altas medianas de contagens destes micro-organismos na seca e na chuva, indicando higiene insatisfatória durante o processo de ordenha e deficiências nas etapas de sanitização dos equipamentos. Além de produtores de metabólitos tóxicos, as micotoxinas, algumas cepas de bolores e leveduras levam a deterioração do leite, determinando uma matéria-prima de baixa qualidade microbiológica e conseqüentemente, um QMA de igual qualidade (Rodríguez-Amaya e Sabino, 2002). O oposto foi observado em leite utilizado na elaboração de queijo Casín e de QMA de produtores cadastrados da região de Campo das

Vertentes, no qual não foram detectadas contagens de bolores e leveduras (Alegría, *et al.*., 2009; Oliveira, 2014).

Não foi isolada *Salmonella* spp. nas amostras de leite analisadas. Esta ausência pode ser atribuída a menor capacidade de competição deste micro-organismo, em relação aos coliformes e a *Staphylococcus* spp. A ocorrência deste micro-organismo em alimentos está, em algumas vezes, associada às contagens menores de outros contaminantes. A possível ausência de contaminação cruzada e as altas contagens de bactérias ácido-láticas no leite podem, também, justificar este dado. Em leite usado na elaboração de queijo artesanal de Vermont não foi detectada *Salmonella* spp. (D'amico e Donnelly, 2010). Por outro lado, em leite usado na elaboração de queijo artesanal de Montes Claros, Minas Gerais, *Salmonella* sp. foi detectada em um amostra (Almeida *et al.*., 2012).

A composição centesimal do leite se encontra na tabela 13. Em relação aos teores percentuais de lactose, proteína e extrato seco total não houve diferença entre as médias dos períodos estudados ($p > 0,05$). Entretanto, o teor médio de gordura do leite foi estatisticamente superior no período de chuva se comparado ao período de seca ($p < 0,05$).

Tabela 13. Médias, coeficientes de variação (CV), medianas, valores mínimo e máximo dos resultados de parâmetros físico-químicos de qualidade de leite cru de queijarias de produtores não cadastrados na região de Campo das Vertentes – MG

Parâmetros físico-químicos	Período	Média	CV(%)	Mediana	Mínimo	Máximo
Lactose (%)	Seca	4,56	2,98	4,55	4,38	4,79
	Chuva	4,46	3,36	4,43	4,27	4,72
Proteína (%)	Seca	3,37	10,11	3,3	3,05	3,94
	Chuva	3,51	8	3,4	3,3	4,03
Gordura (%)	Seca	2,96 ^b	34,3	3,24	0,95	3,79
	Chuva	4,44 ^a	33,72	4,43	2,01	6,49
Extrato Seco Total (%)	Seca	12,37	13,09	11,96	10,25	14,99
	Chuva	13,41	10,58	13,68	11,09	15,2

Médias seguidas por letras distintas na coluna diferem pelo teste F ($p < 0,05$).

Dos componentes do leite, o teor de gordura é o que mais pode variar, em função de variações genéticas, manejo alimentar do rebanho ou até mesmo em função das condições de saúde da vaca. O teor de proteína também pode ser afetado, porém, em menor grau enquanto que o teor de lactose é o menos influenciado (Wattiaux, 2012). Os valores de CV (%) encontrados para cada um destes parâmetros, independentemente da época do ano e mostrados na tabela 12, corroboram esta afirmativa.

A lactose é o principal componente a exercer pressão osmótica no leite. Ao ser produzida, eleva a concentração de água no interior das células epiteliais mamárias. Desta forma, quanto maior a síntese de lactose, maior o volume de leite produzido, sendo mantido, portanto, o mesmo teor de lactose. Assim, o teor de lactose dificilmente é influenciado pela estação do ano, dieta do animal ou outra variável qualquer, a não ser em casos extremos de desnutrição (Peres, 2001). Os valores médios percentuais de lactose do leite, em ambos os períodos, estavam dentro do

preconizado pela legislação que determina valor mínimo de lactose igual a 4,3% (Minas Gerais, 2002b).

A proteína é sintetizada na glândula mamária a partir de aminoácidos essenciais obtidos, sobretudo, da proteína microbiana e da proteína não degradável no rúmen (PNDR). Estas proteínas chegam diretamente no duodeno, resultando em um maior aporte de aminoácidos absorvidos e disponíveis para a glândula (Valadares Filho e Valadares, 2001). Dentre os aminoácidos essenciais, a metionina e a lisina são potencialmente limitantes para a síntese de proteína do leite, de forma que a estação do ano e o tipo de alimento fornecido ao animal dificilmente elevam a concentração destes aminoácidos na dieta, assim como a quantidade e qualidade da proteína microbiana e PNDR que chegam ao intestino do animal (Schwab, 1996). Assim, sabe-se que a dieta do animal pouco influencia na composição da proteína do leite de forma que um aumento de 1% de proteína bruta na dieta, quando esta está entre 9% e 17%, eleva apenas 0,02% da proteína total do leite (Emery, 1978). De fato, não foram observadas diferenças ($p > 0,05$) nos valores percentuais médios de proteína do leite coletado nos períodos de seca e de chuva. Contudo, os altos valores encontrados sugerem um bom rendimento deste leite na elaboração do QMA.

Em leite cru usado na elaboração de queijos artesanais em Montes Claros foram encontrados, em média, 4,7% de lactose e 3,5% de proteína (Almeida *et al.*, 2012). Resultados semelhantes foram encontrados em pesquisa de leite cru para a produção de queijo da Serra da Canastra, que apresentou valores médios de lactose e proteína iguais a 4,54% e 3,15%, respectivamente (Ornelas, 2005).

O teor percentual de gordura pode oscilar entre 2 a 4 unidades percentuais no leite. Fatores como genética, estação do ano, relação volumoso:concentrado, fibra efetiva, tipo de concentrado, fornecimento de gordura e aditivos ao animal podem aumentar ou reduzir o teor de gordura no leite (Wittwer, 2000). A menor média observada no período de seca ($p < 0,05$) pode ser explicada pelo maior fornecimento de concentrado ao animal, em função da menor disponibilidade de forrageira, neste período, se comparado à época da chuva. Nesse sentido, há aumento da produção de ácidos que reduzem o pH do rúmen do animal. Consequentemente, a digestão da fibra fica comprometida, reduzindo a proporção de ácido acético, em contraposição ao ácido propiônico, que aumenta. Sendo o ácido acético o principal precursor da gordura do leite, sua redução estaria diretamente relacionada à queda da gordura do leite (Fontaneli, 2001).

A diferença na concentração de gordura entre as estações também foi relatada em leite utilizado para a produção de queijo Saint-Nectaire, francês, no qual os teores percentuais médios de gordura foram, respectivamente, de 3,7% no verão e 4,37% para o inverno (Leriche e Fayolle, 2012).

Os valores médios de gordura no leite, em ambos os períodos, estavam de acordo com o preconizado pela legislação, de maior ou igual a 3% (Minas Gerais, 2002b). A mesma fazenda foi a responsável pelos valores mínimos de gordura, fora do ideal, nos períodos de seca e chuva, podendo ser atribuídos a este fato falhas no manejo alimentar dos animais e vacas em fase avançada de lactação.

O teor percentual de extrato seco total do leite normalmente acompanha as variações observadas nos teores de gordura. Esta tendência foi observada na tabela 13, em que o valor médio de EST foi, numericamente, maior na seca se comparado ao período chuvoso, embora estatisticamente

iguais ($p>0,05$). A ausência de variação observada nos valores médios de EST entre os períodos estudados, embora o teor de gordura tenha sido maior na seca, ocorreu pela ausência de variação nos demais macro-componentes do leite, proteínas e lactose. Em ambos os períodos, o EST médio do leite estava dentro do preconizado pela legislação, maior ou igual a 11,5%, revelando um leite rico do ponto de vista nutricional (Minas Gerais, 2002b). Resultado semelhante foi relatado em estudo realizado em queijarias cadastradas na região de Campo das Vertentes. As amostras de leite cru analisadas apresentaram média de EST de 13,10%, na seca sendo igual à média de 13,51% obtida no período chuvoso (Oliveira, 2014).

5.6. Qualidade microbiológica de queijo Minas artesanal fresco

Houve diferença ($p<0,05$) na comparação entre as medianas do Número Mais Provável de coliformes a 30°C e a 45°C e entre as contagens de *Staphylococcus* coagulase positivo, bactérias ácido-láticas no meio M17 e bolores e leveduras em queijo Minas artesanal, de acordo com o período em que esses foram produzidos. Apenas nas contagens de *Staphylococcus* spp. e bactérias ácido-láticas no meio MRS, não foram observadas diferenças ($p>0,05$) (tabela 14).

Tabela 14. Médias, coeficientes de variação (CV), medianas, valores mínimo e máximo dos resultados de parâmetros microbiológicos de qualidade de queijo Minas artesanal fresco de queijarias de produtores não cadastrados na região de Campo das Vertentes – MG

Parâmetros microbiológicos	Período	Média	CV(%)	Mediana	Mínimo	Máximo
Coliformes 30°C (NMP/g)	Seca	2203	196,19	355 ^b	120	>11000
	Chuva	9417	41,19	>11000 ^a	1500	>11000
Coliformes 45°C (NMP/g)	Seca	264	160,98	93 ^b	<3	1100
	Chuva	5645	103,92	5715 ^a	92	>11000
<i>Staphylococcus</i> coagulase positivo (UFC/g)	Seca	3,3x10 ⁴	159,29	2,8x10 ^{3b}	<1x10 ³	1,3x10 ⁵
	Chuva	2x10 ⁷	154,68	1,8x10 ^{6a}	<1x10 ³	7,2x10 ⁷
<i>Staphylococcus</i> spp. (UFC/g)	Seca	1,1x10 ⁶	135,1	3,1x10 ⁵	4,7x10 ⁴	3,9x10 ⁶
	Chuva	3,5x10 ⁷	125,1	2,3x10 ⁷	4,8x10 ⁴	1,1x10 ⁸
Bolores e leveduras(UFC/g)	Seca	1,1x10 ⁷	71,08	1,3x10 ^{7a}	1,3x10 ⁵	2,1x10 ⁷
	Chuva	1,4x10 ⁶	239,92	8x10 ^{3b}	<1x10 ³	8,4x10 ⁶
BAL MRS (UFC/g)	Seca	5,1x10 ⁸	138,17	1,3x10 ⁸	1,6x10 ⁶	1,7x10 ⁹
	Chuva	3,2x10 ⁸	137,35	8,8x10 ⁷	5,1x10 ⁷	1,1x10 ⁹
BAL M17 (UFC/g)	Seca	6,4x10 ⁸	108,29	4x10 ^{8a}	1x10 ⁷	1,6x10 ⁹
	Chuva	5,4x10 ⁷	145,63	9,8x10 ^{6b}	6,1x10 ⁶	2x10 ⁸
<i>Salmonella</i> spp. (25g)	Seca			Ausência		
	Chuva			Ausência		

Medianas seguidas por letras distintas na coluna diferem pelo teste de Friedman ($p < 0,05$).

As medianas das contagens de coliformes totais e coliformes termotolerantes foram superiores ($p<0,05$) no período da chuva, se comparadas as obtidas no período da seca. Este resultado era esperado tendo em vista as altas contagens destes micro-organismos, também, no período da chuva, no leite e soro-fermento empregados na elaboração dos queijos, de forma que estas matérias-primas foram fonte direta de contaminação ao produto final. Pelo fato de o queijo

apresentar maior disponibilidade de substrato, os coliformes encontraram um ambiente favorável a sua multiplicação, atingindo valores bem superiores aos observados no leite e no pingo. Além disso, falhas de higienização durante a elaboração e armazenamento do queijo, também poderiam estar associadas a intensificação deste crescimento.

Os coliformes a 30°C em altas contagens são responsáveis pela deterioração do queijo levando a um defeito clássico chamado estufamento precoce. Este defeito é observado entre o processo de elaboração e o processo de salga do queijo, sendo perceptível, logo, nas primeiras 24 horas de produção. A lactose do queijo é fermentada pelas bactérias do grupo coliformes, levando a formação de ácido lático, ácido acético e etanol, que conferem um sabor picante, ligeiramente amargo ao queijo, e também há produção de CO₂ e H₂, gases responsáveis pela formação de olhaduras pequenas no produto final (Furtado, 1991). De fato, queijos de dois produtores, no período da chuva, estavam, no momento da coleta, abaulados e apresentavam micro olhaduras características típicas deste tipo de defeito, ao corte.

Os coliformes a 45°C, principalmente, representados por *Escherichia coli*, fazem parte da microbiota intestinal de animais de sangue quente, incluindo o homem. Sua presença no queijo pode indicar, além de falhas no processo de higienização durante o processamento do QMA, presença de material de origem fecal e de outros micro-organismos enteropatogênicos. Desta forma, além de causarem a deterioração do queijo, algumas cepas são comprovadamente patogênicas ao homem e aos animais (Jay *et al.*., 2005; Trabulsi e Altherthum, 2005).

Oliveira (2014), ao analisar QMA maturados por 60 dias de propriedades cadastradas ao IMA da região de Campo das Vertentes, encontrou Número Mais Provável de coliformes a 30°C e a 45°C semelhantes ao relatados no presente estudo. Da mesma forma, os valores médios de NMP/g foram superiores no período chuvoso se comparados aos valores médios do seco ($p > 0,05$). No período da seca, a contagem de coliformes a 30°C reduziu ao longo da maturação ($p < 0,05$).

Altas contagens também foram relatadas em queijos Coloniais, com e sem inspeção, da microrregião de Francisco Beltrão- PR, nos quais foram encontradas contagens entre < 3 a > 11.000 NMP/g tanto para coliformes totais quanto para termotolerantes (Silva e Silva, 2013).

A presença de altas contagens de *Staphylococcus* spp. nos queijos, na seca e na chuva, está associada as altas contagens deste micro-organismo observadas, também, no soro-fermento e no leite, em ambos os períodos avaliados. A presença destes micro-organismos em contagens superiores a 10⁴ UFC/g, em todas as propriedades, tanto no período de seca quanto no de chuva, é preocupante devido a possibilidade de produção de enterotoxinas no alimento. Embora a legislação determine parâmetros de aceitação no queijo apenas para *Staphylococcus* coagulase positivo, é sabido que algumas cepas coagulase negativo, incluídas nesta contagem total de *Staphylococcus* spp., são também capazes de produzirem enterotoxinas, representando um risco potencial a saúde do consumidor.

Quanto às contagens de *Staphylococcus* coagulase positivo, apenas queijos de duas queijarias no período de seca e uma no período de chuva apresentaram adequação a legislação estadual (Minas Gerais, 2008), sendo que a mediana das contagens no período de chuva foi superior àquela encontrada no período de seca ($p < 0,05$). Grande parte desta diferença, entre períodos do ano, pode ser inicialmente atribuída à utilização de um soro-fermento, também mais contaminado por este micro-organismo, na chuva, conforme mostra a tabela 10. O soro-

fermento seria então o responsável pela contaminação direta do queijo a partir dele produzido. As altas contagens, de até $7,2 \times 10^7$ UFC/g, de *Staphylococcus* coagulase positivo nos queijos coletados, principalmente, no período de chuva, quando comparadas àquelas contagens encontradas no soro-fermento, podem ser explicadas pela manipulação inadequada do QMA durante o seu processamento. De fato, 42,86% dos manipuladores foram considerados portadores deste micro-organismo em suas mãos, sendo esta, talvez a causa mais importante para estas altas contagens de *Staphylococcus* coagulase positivo observadas. Outra possível fonte de contaminação desta bactéria no queijo é a água de abastecimento das queijarias, usada tanto na limpeza e higienização dos utensílios, quanto na lavagem dos queijos, etapa realizada em todas as queijarias (item 4.1). Embora a pesquisa direta de *Staphylococcus* coagulase positivo não tenha sido realizada nas amostras de água, as maiores contagens de mesófilos aeróbios nas mesmas, no período da chuva, poderiam indicar, indiretamente, maior contaminação por *Staphylococcus* coagulase positivo e, conseqüentemente, maior contaminação por estes micro-organismos nos queijos.

A não conformidade dos resultados obtidos à legislação estadual (Minas Gerais, 2008) era esperada, tendo em vista que esta não é específica para queijos Minas artesanais frescos, mas sim para os QMA maturados. As altas contagens encontradas reforçam o risco microbiológico associado ao consumo fresco do queijo Minas artesanal, ao mesmo tempo em que corroboram a importância de um período mínimo de maturação deste queijo para que haja redução dessas contagens e, conseqüentemente, deste risco.

As altas contagens de *Staphylococcus* coagulase positivo encontradas são de grande preocupação, uma vez que não foi pesquisada a presença de enterotoxinas nos queijos analisados. Torna-se necessária, então, em pesquisas futuras, a detecção dessas enterotoxinas nos queijos para a certificação de qualidade e inocuidade do queijo Minas artesanal elaborado nas propriedades visitadas.

De forma semelhante a este estudo, embora com valores um pouco inferiores, as contagens médias de *Staphylococcus* spp. em QMA da Serra da Canastra, maturado a temperatura ambiente, de $1,9 \times 10^4$ UFC/g, na chuva, e de $3,2 \times 10^3$ UFC/g, na seca, não foram diferentes ($p > 0,05$) (Dores *et al.*, 2013). Por outro lado, contagem média superior, de $2,1 \times 10^8$ UFC/g, de *Staphylococcus* spp. foi descrita em propriedades não cadastradas, na mesma região (Resende, 2010).

Resultados semelhantes também foram descritos em QMA do Serro em que a contagem de *Staphylococcus aureus*, aos oito dias de maturação, de $2,5 \times 10^3$ UFC/g, nas águas, foi superior a contagem encontrada de $1,1 \times 10^2$ UFC/g, na seca ($p < 0,05$). A alta temperatura ambiente na época da chuva foi determinada como a causa do aumento desta contagem (Martins, 2006). Maior contagem média de *Staphylococcus* coagulase positivo no período das chuvas, se comparado aos resultados do período seco, também foi relatada em QMA da região de Campo das Vertentes (Oliveira, 2014).

As bactérias ácido-láticas, enumeradas tanto em meio MRS quanto em M17, foram os micro-organismos predominantes no queijo Minas artesanal de Campo das Vertentes. Suas contagens medianas em ágar M17 foram superiores ($p < 0,05$) no período da seca quando em comparação com o período da chuva. Uma possível justificativa para esta variação é a adição de maior volume de soro-fermento ao leite, durante a elaboração do queijo, no período da seca. A maioria dos produtores relatou esta prática como tentativa de manter o processo de coagulação do leite

dentro da normalidade, uma vez que as baixas temperaturas, típicas do período seco, são responsáveis pelo retardamento desta etapa de coagulação, levando a obtenção de um queijo pouco consistente.

Outra possível explicação para a maior contagem de BAL no meio M17, na seca, é a menor concentração de bactérias do grupo coliformes, neste mesmo período, que também são micro-organismos capazes de utilizar a lactose para fermentação. Desta forma, houve menor competição por nutrientes no queijo, resultando no aumento das contagens de BAL na seca. Vale ressaltar que o decréscimo de coliformes nesta condição, possivelmente, não seu deu apenas pela competição estabelecida entre os micro-organismos, mas, também, pela produção de ácido lático e talvez por bacteriocinas pelas BAL presentes.

A ausência de variações nas contagens de BAL no meio MRS nos queijos entre os períodos avaliados ($p > 0,05$) seguiu a tendência observada tanto no leite quanto no soro-fermento utilizados em sua elaboração, nos quais, também não foram observadas diferenças nas contagens entre o período de seca e chuva. Contudo, a adição de menor quantidade de soro-fermento e maior competição por nutrientes no período da chuva não foram suficientes para levarem a uma menor contagem destas BAL no queijo, ou por estas serem melhores competidoras e/ou produtoras de compostos antagonistas que as BAL isoladas no meio M17, ou por apresentarem crescimento ótimo em temperaturas mais elevadas, como as observadas no período de chuva.

Contagens parecidas foram relatadas em pesquisa de BAL em QMA do Serro maturado por uma semana à temperatura ambiente, em que a média encontrada foi de $7,9 \times 10^7$ UFC/g (Santos, 2010). De forma semelhante, em propriedades não cadastradas localizadas na região da Serra da Canastra, BAL também foi a microbiota dominante com contagens médias de $3,0 \times 10^7$ UFC/g no meio MRS, e 10^8 UFC/g no meio M17 (Resende *et al.* , 2011).

A presença de bolores e leveduras no queijo artesanal de Campo das Vertentes era esperada, uma vez que estes produtos apresentam alta umidade e são acondicionados em ambientes não controlados, sujeitando o queijo a esse tipo de contaminação. De fato, alguns queijos, quando analisados a olho nu, apresentavam crescimento fúngico em suas cascas. Embora não haja padrão para esses micro-organismos na legislação, foram encontradas altas contagens de bolores e leveduras nos queijos analisados, de forma que a mediana da contagem no período da seca foi superior a encontrada no período da chuva ($p < 0,05$).

A maior contagem de bolores e leveduras no período seco pode estar associada a maior contagem de BAL neste período. Nesse sentido, houve uma intensificação no processo de fermentação da lactose pelas BAL presentes na matriz do queijo, com formação de grande quantidade de ácido lático (tabela 15). As elevadas concentrações deste composto no queijo inibem grande parte da microbiota patogênica e competidora dos bolores e leveduras. Estes, por sua vez, por serem micro-organismos tolerantes a acidez, encontraram um ambiente propício para sobreviverem e se multiplicarem (Silva *et al.* , 2007).

Outra explicação para a maior contagem de bolores e leveduras no queijo no período de seca é a grande presença de partículas de poeira no ar que disseminam os esporos, a forma infectante destes micro-organismos. Além disso, um dos proprietários relatou que em julho, época das coletas do período seco, a janela de sua queijaria foi esquecida aberta por alguns dias, em decorrência de uma viagem particular. Houve aumento da umidade relativa do ar, registrada por

auxílio de um termo-higrômetro no interior da queijaria, e proliferação de fungos nas prateleiras de maturação dos queijos. De fato, o queijo desta queijaria apresentou o valor máximo de contagem obtida, no período seco, de $2,1 \times 10^7$ UFC/g, sendo a grande responsável pela elevação das contagens de bolores e leveduras.

Altas contagens de bolores e leveduras indicam sanitização deficiente no processamento do alimento ou utilização de matéria-prima pouco qualificada (Rodrigues, 2005). Estes micro-organismos são preocupantes, principalmente devido a possibilidade de produção de micotoxinas, lesivas ao homem (Franco e Landgraf, 2003). Nesse sentido, o uso de sorbato de sódio tem sido aconselhado como método alternativo no controle do crescimento de bolores e leveduras nos queijos (Araújo, 1990). Segundo a Portaria 146, do MAPA, o ácido sórbico e seus sais de sódio, potássio e cálcio têm função conservadora e podem ser aplicados, em limite máximo de utilização de 1000mg/Kg de queijo, em queijos de muito alta, alta, média e baixa umidade (Brasil, 1996).

O oposto a este trabalho foi relatado em queijo Serrano, em que as contagens de bolores e as contagens de leveduras, aos sete dias de maturação, no verão, de 5×10^4 UFC/g e $1,1 \times 10^6$ UFC/g, respectivamente foram superiores aos encontrados no inverno, de $3,3 \times 10^2$ e $3,2 \times 10^5$ UFC/g, respectivamente (Souza *et al.*, 2003). Em trabalho realizado com QMA de Campo das Vertentes não houve diferença ($p > 0,05$) nas contagens de bolores e leveduras entre o período seco, que apresentou contagem média de 10^6 UFC/g, e o período chuvoso, com contagem média de $2,2 \times 10^6$ UFC/g (Oliveira, 2014). Contagens semelhantes de leveduras foram encontradas em queijo Minas artesanal da Serra da Canastra (Borelli, *et al.*, 2006b).

Por fim, *Salmonella* spp. não foi detectada nos queijos analisados. A ausência de contaminação por este micro-organismo nas matérias-primas utilizadas, o cuidado com a manipulação adequada do queijo e as prevenções contra as contaminações cruzadas, além da possível atividade antagonista das BAL presentes, são explicações para a ausência deste patógeno nos QMA artesanais frescos amostrados.

A ausência de *Salmonella* spp. em queijos artesanais também foi relatada em QMA do Serro, Araxá e Campo das Vertentes e em queijos Coloniais (Brant *et al.*, 2007; Araújo, 2004; Oliveira, 2014; Silva e Silva, 2013). Por outro lado, *Salmonella* spp. foi isolada em queijos artesanais, na primeira semana de maturação, no Serro e em queijos comercializados clandestinamente em Jacaraí/São Paulo, o que representa um risco a saúde do consumidor (Martins, 2006; Sousa *et al.*, 2006).

5.7. Qualidade físico-química de queijo Minas artesanal fresco

Houve diferença ($p < 0,05$) entre as médias de acidez titulável dos queijos coletados nos períodos de seca e de chuva. Para os demais parâmetros físico-químicos, não houve esta diferença entre os períodos estudados ($p > 0,05$) (tabela 15).

Tabela 15. Médias, coeficientes de variação (CV), medianas, valores mínimo e máximo dos resultados de parâmetros físico-químicos de qualidade de queijo Minas artesanal fresco de queijarias de produtores não cadastrados na região de Campo das Vertentes – MG

Parâmetros físico-químicos	Período	Média	CV(%)	Mediana	Mínimo	Máximo
Umidade (%)	Seca	55,97	10	57,68	45,04	60,7
	Chuva	49,35	10,61	49,16	42,08	56,16
Extrato seco total (%)	Seca	44,03	12,71	42,32	39,3	54,96
	Chuva	50,65	10,34	50,84	43,84	57,92
Proteína (%)	Seca	17,54	15,03	17,86	14,06	20,35
	Chuva	19,86	13,17	19,52	16,52	24,58
Gordura (%)	Seca	28,28	18,4	28	20,67	37
	Chuva	29,06	26,74	29,17	17,33	40
GES (%)	Seca	64,3	13,87	66,44	46,91	72,94
	Chuva	56,81	19,66	60,71	37,59	69,06
Acidez titulável (% de ácido láctico)	Seca	0,15 ^a	47,04	0,16	0,04	0,24
	Chuva	0,08 ^b	71,46	0,05	0,03	0,17
pH	Seca	5,53	8,75	5,39	5,13	6,48
	Chuva	5,44	7,57	5,54	4,84	5,86

Médias seguidas por letras distintas na coluna diferem pelo teste F ($p < 0,05$).

O extrato seco total (EST) e a umidade são influenciados por uma série de fatores durante a elaboração do QMA, como o tamanho do grão obtido no corte da coalhada; velocidade, tempo e temperatura de mexedura da massa; temperatura e umidade relativa do ar; teor de sal presente e o tempo de maturação do queijo.

Neste estudo, em que as condições ambientais foram diferentes nos períodos avaliados, esperavam-se, da mesma forma, diferenças entre os resultados físico-químicos dos queijos Minas artesanais. Essa expectativa não foi confirmada como mostram os resultados da tabela 15, em que as médias de umidade e EST dos QMA frescos coletados no período de seca e chuva foram similares ($p > 0,05$). Isso ocorreu devido ao pouco tempo de permanência dos QMA sob as condições ambientais na queijaria, uma vez que foram coletados com um dia de produção. Desta forma, a estação do ano pouco ou nada influenciou no teor de umidade dos queijos, ficando este papel a cargo das técnicas de elaboração do QMA, que foram realizadas de forma semelhante nos dois períodos amostrados. Por isso, a ausência de variação de umidade e extrato seco total nos queijos.

Os valores médios de umidade dos queijos elaborados tanto no período de seca, quanto no período de chuva, foram superiores ao preconizado pela legislação estadual (Minas Gerais, 2008). Este fato era esperado tendo em vista que a legislação estadual é adotada para queijos maturados, que apresentam menores teores de umidade quando comparados a queijos mais frescos. O QMA fresco elaborado no período chuvoso com umidade média de 49,35% se classifica como de alta umidade, enquanto que o QMA fresco do período seco, com média de 55,97%, classifica-se como queijo de muito alta umidade. A maior umidade do queijo no período seco, mesmo que apenas numericamente, foi suficiente para torná-lo ainda mais distante

do ideal. Isso pode ser explicado pelo hábito relatado por alguns produtores de lavarem o queijo, mais precocemente, no período da seca, como tentativa de prevenir o ressecamento do mesmo, defeito indesejado pelo comprador e esperado neste período.

O alto teor de umidade dos queijos amostrados, como revela a tabela 15, favorece o desenvolvimento microbiano, justificando, em parte, as elevadas contagens dos patógenos estudados. Sob condições de alta umidade e disponibilidade de nutrientes, como é o caso do ambiente encontrado em alguns destes queijos, os micro-organismos, em poucas horas, passam pela fase *lag* de suas curvas de crescimento, momento em que se encontram em estado de latência, e tão logo entram na fase *log*, aumentando exponencialmente suas contagens nos alimentos (Jay *et al.*, 2005). Estes queijos consumidos de forma fresca representam, portanto, um risco potencial a saúde do consumidor, além de deteriorar mais rapidamente pela intensificação dos processos enzimáticos e bioquímicos. Estes dados reafirmam a importância do processo de maturação na redução da umidade do QMA a teores que o enquadre ao exigido pela legislação, de forma a permitir o controle da proliferação bacteriana no produto. Além, claro, da produção de compostos antagonistas pelas BAL, e a incorporação de sal na massa do produto, durante o processo de cura do queijo, que auxiliam no combate a microbiota patogênica.

Em trabalho realizado em Campo das Vertentes, a maturação do queijo por 60 dias foi suficiente para que as amostras apresentassem teor de umidade dentro do exigido pela legislação de 36,83% e 39,45% nos períodos de chuva e seca, respectivamente (Oliveira, 2014). Valor superior de umidade, semelhante ao apresentado pelo queijo coletado no período da seca neste estudo, foi relatado em QMA de São João del-Rei, município de Campo das Vertentes, em que a porcentagem de umidade presente nos queijos foi em média de 58,3% (Oliveira, 2010).

A porcentagem de EST em queijos Minas artesanais da Serra da Canastra maturados por 8 dias foi avaliada por Silva *et al.* (2011) em duas estações do ano. No verão, o EST foi de 55,07% e no inverno, de 57,47%. Não houve diferença significativa entre os períodos avaliados. A ausência de variação entre os valores médios de EST, embora discrepantes aos encontrados no presente estudo, foi relatada em queijo Minas artesanal de Campo das Vertentes maturado por 30 dias que apresentou EST médio de 67,4 % no período chuvoso e 61% no período seco (Moreno, 2013).

As médias da porcentagem de gordura no extrato seco total (GES) de 64,3% no período de seca e de 56,81% no período de chuva classificam os queijos estudados como extra gordo e gordo, respectivamente, de acordo com a legislação federal (Brasil, 1996). Embora o teor percentual de gordura do leite tenha sido superior no período das águas ($p < 0,05$), as médias das gorduras dos queijos não foram diferentes ($p > 0,05$) nos períodos estudados. De fato, o teor de gordura do queijo está intimamente relacionado ao teor de gordura do leite, mas pode ser influenciada por outros fatores como o teor de umidade do queijo, tempo de maturação e presença de micro-organismos lipolíticos no alimento.

Queijo Minas artesanal de Araxá apresentou porcentagem de gordura média de 28,29%, com mínimo de 23% e máximo de 35,5% (Araújo, 2004) de gordura nas amostras, a semelhança dos valores encontrados neste estudo. Em pesquisa realizada em Campo das Vertentes, a porcentagem de gordura nos queijos foi superior às relatadas na tabela 14, por abordar queijos maturados por 60 dias. A média do teor de gordura dos queijos de até 30 dias de maturação, no período chuvoso, de 34,1% foi igual a encontrada de 33,4%, no período seco (Moreno, 2013).

Valores semelhantes de proteína total foram relatados em queijos Minas Artesanais produzidos nas microrregiões do Serro, Serra da Canastra e Cerrado que apresentaram médias de 14,08%, 18,51% e 14,55%, respectivamente (Oliveira *et al.* , 2013). Na região do Serro, outros dois trabalhos relataram a presença de 17,06% e 22,40% de proteína nas amostras analisadas (Machado *et al.* , 2004; Pinto, 2004). Em trabalho realizado em QMA de Campo das Vertentes também não foram observadas diferenças quanto ao teor médio de proteína do queijo elaborado nos períodos seco e chuvoso (Oliveira, 2014).

A média da acidez titulável do QMA produzido na época da seca foi superior àquela encontrada do queijo no período da chuva ($p < 0,05$). Isso pode ser justificado pela maior quantidade de soro-fermento adicionado pelos produtores no queijo produzido na seca, como citado, anteriormente. Esta prática elevou as contagens de bactérias ácidas lácticas no queijo no período seco ($p < 0,05$). Desta forma, houve maior produção de ácido láctico, principal composto metabólico produzido durante a fermentação da lactose. Essa maior acidez titulável do queijo justifica, em parte, as menores contagens ($p < 0,05$) de *Staphylococcus* coagulase positivo, coliformes a 30°C e a 45°C e a ausência de *Salmonella* spp., no queijo analisado no período de seca. Em contrapartida, cria um ambiente favorável ao desenvolvimento e multiplicação dos bolores e leveduras, que apresentaram, de fato, maiores contagens ($p < 0,05$) que àsquelas encontradas no período de chuva. Por outro lado, não foram observadas diferenças no pH dos queijos analisados ($p > 0,05$), corroborando o fato de que não existe uma correlação direta entre os valores de acidez e pH em um alimento (Scott, 2002; Cecchi, 2003).

O oposto a este trabalho, quanto à não variação ($p > 0,05$) entre os períodos de seca e chuva para acidez titulável foi relatado em queijo Minas artesanal do Serro (Martins, 2006) e em pesquisa de queijo Serrano (Souza *et al.* , 2003).

Em QMA de Campo das Vertentes, maturado por 30 dias, o pH de 5,25 no período chuvoso foi superior ao pH de 5,04 no período seco ($p < 0,01$) (Moreno, 2013). Valores semelhantes foram descritos por Costa Junior *et al.* (2014) em pesquisa realizada na mesma região, em que o pH do queijos no período chuvoso variou de 5,1 a 5,5 e no período seco de 5 a 5,1.

5.8. Identificação molecular de bactérias ácido-láticas isoladas de amostras de água, leite cru, soro-fermento e queijo Minas artesanal fresco

Ao todo, foram identificados ao nível molecular, pela amplificação e sequenciamento do gene 16S rDNA, 50 micro-organismos, sendo três isolados de água (6%), nove isolados de leite (18%), 17 de soro-fermento (34%) e 21 de queijo Minas artesanal fresco (42%). Perfil semelhante de isolamento, como as menores quantidades de micro-organismos observadas em leite e as maiores quantidades em queijo foi verificado em outros estudos envolvendo queijos artesanais mineiros (Lima *et al.* , 2009; Resende, 2011). Segundo Borelli (2006), a adição do soro-fermento ao leite, com menor contagem microbiana, eleva a contagem de micro-organismos nas amostras de queijo Minas artesanal, por proporcionarem um ambiente mais propício ao desenvolvimento destes.

A distribuição das espécies de BAL isoladas a partir de amostras de água, leite, soro-fermento e queijo Minas artesanal fresco coletadas nos períodos de seca e de chuva, nas propriedades rurais não cadastradas da região de Campo das Vertentes, está apresentada na tabela 16. A figura 9, no Anexo 2, mostra o gel de agarose com o produto de amplificação do gene 16S rDNA de algumas das amostras.

Tabela 16. Identificação molecular de bactérias ácido-láticas isoladas a partir de amostras de água, leite cru, soro-fermento e queijo Minas artesanal fresco coletadas de queijarias de produtores não cadastrados na região de Campo das Vertentes – MG, de acordo com o período do ano

MICRO-ORGANISMOS	PERÍODO DO ANO		
	SECA	CHUVA	TOTAL
ÁGUA			
<i>Lactococcus lactis</i>	3	–	3
total	3	–	3
LEITE CRU			
<i>Enterococcus faecalis</i>	6	–	6
<i>Lactococcus lactis</i>	1	–	1
<i>Lactobacillus plantarum</i>	–	2	2
total	7	2	9
SORO-FERMENTO			
<i>Aerococcus viridans</i>	1	–	1
<i>Lactobacillus plantarum</i>	–	3	3
<i>Enterococcus faecalis</i>	4	3	7
<i>Enterococcus pseudoavium</i>	1	–	1
<i>Lactobacillus brevis</i>	–	1	1
<i>Enterococcus durans</i>	–	1	1
<i>Lactobacillus paracasei</i>	–	1	1
<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	2	–	2
total	8	9	17
QUEIJO MINAS ARTESANAL FRESCO			
<i>Lactococcus lactis</i>	5	1	6
<i>Lactobacillus plantarum</i>	–	3	3
<i>Enterococcus faecalis</i>	5	4	9
<i>Lactococcus garvieae</i>	–	1	1
<i>Enterococcus faecium</i>	–	1	1
<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	–	1	1
total	10	11	21
TOTAL	28	22	50

As espécies *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus paraplantarum* e *Lactobacillus pentosus* são genotipicamente muito próximas entre si e podem demonstrar fenótipos semelhantes (Torriani *et al.* , 2001). Portanto, a amplificação do 16S rDNA não é suficiente para a diferenciação entre estas espécies, devido ao valor elevado de identidade (99%) partilhada por elas. A técnica de PCR *multiplex*, por sua vez, permite a utilização de mais de um par de iniciadores na mesma reação, auxiliando na identificação de mais de uma espécie de micro-organismo na mesma reação de PCR (Kwon *et al.* , 2004). Sendo assim, apenas após a realização de PCR *multiplex* para amplificação da região do gene *recA* (Torriani *et al.* , 2001) foi possível identificar todas as oito amostras, não discriminadas pelo sequenciamento, como

sendo pertencentes a espécie *Lactobacillus plantarum*. A figura 10, no anexo 3, apresenta a foto do gel de agarose após a PCR *multiplex*, revelando a amplificação de *amplicons* com 318 pb, correspondentes a espécie *Lactobacillus plantarum*.

A diferenciação entre as espécies *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus paracasei* e *Lactobacillus rhamnosus* também não foi possível pelo sequenciamento do gene 16S rDNA, pelo mesmo motivo citado, sendo necessária a realização de PCR específica para tal. Usando *primers* específicos para cada uma destas espécies, com base em diferenças na região V1 do gene 16S rDNA (Ward e Timmins, 1999), foi possível identificar um isolado de *Lactobacillus paracasei* e um isolado de *Lactobacillus rhamnosus*. A figura 11, no anexo 4, apresenta a foto do gel de agarose após a PCR. Pode-se observar a amplificação de *amplicon* apenas quando o *primer para* foi utilizado na reação da primeira amostra, confirmando a presença de *Lactobacillus paracasei*. Da mesma forma, houve a amplificação de *amplicon* apenas quando o *primer rham* foi utilizado na reação de amplificação da segunda amostra, confirmando a presença de *Lactobacillus rhamnosus*.

Dentre as amostras identificadas, *Enterococcus faecalis* foi a espécie de BAL mais frequentemente isolada de leite, soro-fermento e queijo Minas artesanal fresco, tanto no período de seca quanto no de chuva, das queijarias não cadastradas no IMA na região de Campo das Vertentes. Este resultado é semelhante ao relatado em queijo Minas artesanal das regiões da Serra da Canastra e da Serra do Salitre, em que *Enterococcus* spp. foi o gênero mais encontrado em amostras de leite e de soro-fermento e QMA, respectivamente (Resende *et al.* , 2011; Lima *et al.* , 2009). Da mesma forma, em queijos artesanais Roncal e Idiazabal, *Enterococcus* spp. também foi o gênero predominante, sendo as espécies mais encontradas *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium*, *Enterococcus durans* e *Enterococcus avium* (Arizcum *et al.* , 1997). Resultados semelhantes foram encontrados em pesquisa realizada em queijos artesanais Asiago, Montasio, Monte Veronese e Fontina, produzidos na Itália em que *Enterococcus faecalis* foi a espécie mais isolada dentre o gênero *Enterococcus* spp., seguido por *Enterococcus faecium*, *Enterococcus durans* e *Enterococcus gallinarum* (Andrighetto *et al.* , 2001).

A presença de *Enterococcus faecalis* em grande proporção nos isolados não é desejável. Isso porque estes micro-organismos compõem a microbiota intestinal de alguns mamíferos e aves (Jay *et al.* , 2005) e, quando em altas contagens no alimento, podem indicar práticas higiênicas inadequadas durante o processamento do QMA (Franco e Landgraf, 2003).

Embora o isolamento de *Enterococcus durans* seja comum em leite e em produtos lácteos (Colman *et al.* , 1992), este parece ser o primeiro relato de isolamento deste micro-organismo em soro-fermento usado na elaboração de queijo Minas artesanal. A presença de *Enterococcus durans* pode ser de grande interesse no processamento do QMA, uma vez que seu metabolismo durante o processo de maturação libera enzimas e compostos aromáticos, como diacetil e acetoína, responsáveis pelo sabor, aroma e textura dos queijos (Centeno *et al.* , 1996). Além disso, muitos trabalhos revelam características probióticas de algumas cepas de *Enterococcus durans* isoladas de diferentes produtos lácteos (Ambadoyiannis *et al.* , 2005; Batdorj *et al.* , 2006; Psoni *et al.* , 2006; Hermanns *et al.* , 2013; Acurcio *et al.* , 2014).

Uma amostra de *Enterococcus pseudoavium* foi obtida de soro-fermento no período da seca. É, provavelmente, o primeiro relato desta espécie em soro-fermento usado na elaboração de queijos artesanais. A semelhança dos QMA frescos de queijarias não cadastradas de Campo das Vertentes, embora o trabalho tenha sido realizado em outro produto, apenas uma amostra foi

obtida da microbiota intestinal de peixes. Ao teste de atividade antimicrobiana, ela foi resistente a diferentes antimicrobianos, em especial, à tetraciclina e à oxacilina. Por outro lado, foi sensível à vancomicina (Bourouni *et al.* , 2012). Em outro trabalho em que as BAL também haviam sido isoladas da microbiota de peixe, *Enterococcus pseudoavium* apresentou a melhor atividade antagonista, *in vitro*, frente a patógenos aquáticos de interesse (Hagi e Hoshino, 2009). Mais estudos, portanto, devem ser realizados com o intuito de caracterizar a importância da presença deste micro-organismo em queijo Minas artesanal, focando tanto nas suas características indesejáveis quanto nas possíveis características desejáveis ao produto.

De forma geral, a presença de *Enterococcus* spp. em alimentos é questionada pelo fato de muitas cepas serem patogênicas ao homem, causando infecções cardiovasculares, do trato urinário e do sistema nervoso, por exemplo (Murray, 1990). O desconhecimento acerca de seus fatores de virulência e a transmissão cruzada comprovada de resistência a importantes antimicrobianos, como a vancomicina, a outros micro-organismos limitam sua utilização na indústria de alimentos, sobretudo, quando o foco for a elaboração de produtos probióticos (Cetinkaya *et al.* , 2000). Por outro lado, a presença desta bactéria em queijos está relacionada a produção de compostos aromáticos que contribuem para as características sensoriais dos queijos (Trovatelli *et al.* , 1987). Além disso, *Enterococcus* spp. são potentes produtores de bacteriocinas, que são responsáveis pela inibição do crescimento de patógenos de interesse alimentar, como *Listeria monocytogenes* e *Staphylococcus aureus* (Ennahar *et al.* , 2001; Sarantinopoulo *et al.* , 2002; Ghrairi *et al.* , 2008).

Lactococcus lactis foi isolado tanto no período de seca, quanto no período de chuva. Frequentemente, é o principal constituinte de muitos fermentos industriais e artesanais utilizados na fermentação de produtos lácteos, embora, contraditoriamente, não tenha sido isolado de soro-fermento (Smit *et al.* , 2005). *Lactococcus lactis* é a espécie mais usada para a produção de ácido nas fermentações lácteas, pois são capazes de converter rapidamente a lactose em ácido láctico. Por isso, são geralmente predominantes em queijos frescos, como os coletados neste trabalho, como agentes iniciadores do processo de acidificação, sendo que sua presença é reduzida durante o processo de maturação (Fontán *et al.* , 2001; López-Díaz *et al.* , 2000).

Em queijo artesanal Castelmagno PDO, da região do Vale de Grana (noroeste da Itália), *Lactococcus* spp. ocorreu entre os isolados durante a produção e no primeiro mês de maturação do queijo, sendo *Lactococcus lactis* a espécie mais frequente (Dolci *et al.* , 2010). De forma semelhante as amostras identificadas neste presente estudo, queijos Cebreiro, um queijo fresco pouco maturado elaborado a partir de leite cru no nordeste da Espanha, apresentou *Lactococcus lactis* como a segunda espécie dominante da microbiota láctica, sendo *Enterococcus faecalis* a predominante (Centeno *et al.* , 1996). O oposto foi relatado por Estepar *et al.* (1999), ao avaliarem a microbiota láctica do queijo artesanal Peñamellera, em que *Lactococcus* spp. foi o gênero predominante. Em leite de vaca cru usado na elaboração de queijo coalho regional, *Lactococcus lactis*, assim como mostra os dados da tabela 15, também não foi a espécie de BAL mais frequente dentre as amostras identificadas molecularmente (Cavalcante *et al.* , 2007).

O isolamento de *Lactococcus lactis* em amostras de água das queijarias vai ao encontro de que este micro-organismo pode sobreviver fora do ambiente de laticínios, em ambientes variados, como água, solo, esgoto, silagem e esterco (Klijn, 1995; Nomura *et al.* , 2006; Ortalini, 2009). A presença desta bactéria na água reafirma o importante papel desta no fornecimento de micro-organismos desejáveis ao produto final. Não foram encontrados na literatura relatos de

isolamento de *Lactococcus lactis* em água usada na higienização dos utensílios e lavagem de queijos Minas artesanais. Em outro contexto, como na República Tcheca, *Lactococcus lactis* foi isolado de diferentes tipos de águas superficiais (Švec e Sedláček, 2008). No Japão, *Lactococcus lactis* isolado da água do lago Motosu foi capaz de produzir bacteriocinas contra alguns patógenos Gram positivo (Yanagida *et al.* , 2006).

Lactobacillus plantarum foi isolado apenas no período de chuva, e dentre os micro-organismos identificados, foi encontrado em igual quantidade nas amostras de queijo e soro-fermento e em quantidade, um pouco inferior, nas amostras de leite. Em trabalho realizado na região da Serra da Canastra, *Lactobacillus plantarum* foram os principais micro-organismos isolados das amostras de leite, soro-fermento e queijo Minas artesanais (Resende *et al.* , 2011). Em outro trabalho, na mesma região, *Lactobacillus plantarum* foi a espécie com frequência mais alta em amostras de soro-fermento (Borelli, 2006).

Lactobacillus plantarum é considerado pela *European Food Safety Authority* (EFSA) como um micro-organismo que se enquadra na suposição de segurança qualificada, abordagem usada para a avaliação de segurança das bactérias (EFSA painel Biohaz, 2013). Esta avaliação requer a identidade do micro-organismo para que sua segurança seja determinada de forma concludente, e evidencia que a cepa avaliada não pode ser resistente a antimicrobianos de importância na medicina humana e medicina veterinária. Em trabalho realizado em QMA da região da Canastra, *Lactobacillus plantarum* foram sensíveis aos antimicrobianos eritromicina e tetraciclina e resistentes a ciprofoxacina, gentamicina, oxacilina, estreptomicina e vancomicina (Andrade, 2012).

Lactobacillus plantarum é facultativamente heterofermentativo, ou seja, fermenta hexoses em ácido lático e pode também fermentar pentoses, através de uma fosfocetolase induzida para produzir ácidos lático e acético (Axelsson, 2004). Alguns trabalhos realizados com amostras obtidas de queijos artesanais da Serra Canastra o apontam como micro-organismo de elevado potencial probiótico, *in vitro*, capaz de tolerar altas concentrações de sais biliares e ácidos e apresentar atividade antagonista contra bactérias patogênicas de interesse alimentar, como *Listeria monocytogenes* e *Staphylococcus aureus* (Andrade, 2012; Oliveira, 2012). Além disso, a produção de bacteriocinas por esta espécie isolada a partir queijos artesanais já foi descrita (Ennhar *et al.*, 1996; Mills *et al.* , 2011), sugerindo que *Lactobacillus plantarum* seja uma bactéria de interesse no queijo, tanto pela proteção a agentes patogênicos quanto pela sua contribuição para o desenvolvimento do sabor (Ouahghiri *et al.*, 2005).

Uma amostra de *Lactobacillus rhamnosus* e outra de *Lactococcus garvieae* foram obtidas de queijo elaborado no período da chuva. Da mesma forma, uma amostra de *Lactobacillus paracasei* e outra de *Lactobacillus brevis* foram obtidas apenas de amostras de soro-fermento, também coletadas na mesma época do ano. Pelo menos uma destas espécies de BAL já foi isolada em outros trabalhos envolvendo queijos artesanais e leite cru, em diferentes países do mundo (El Soda *et al.* , 2003; Borelli, 2006; Coppola *et al.* , 2006; Almeida, 2007; Terzic-Vidojevic *et al.* , 2009; Resende *et al.* , 2011; Nóbrega, 2012; Feutry *et al.* , 2012). Embora *Lactobacillus brevis* já tenha sido previamente isolado em amostras de queijos Minas artesanais (Borelli, 2006), não houve, na literatura pesquisada, relatos da sua presença em soro-fermento usado na elaboração deste tipo de queijo.

Lactobacillus rhamnosus, *Lactobacillus paracasei* e *Lactobacillus brevis* representam exemplos de micro-organismos desejáveis à produção de queijos artesanais tanto pelas características

sensoriais dadas ao produto quanto por serem micro-organismos com importante papel probiótico.

Lactobacillus rhamnosus e *Lactobacillus paracasei* compõem o grupo taxonômico “*Lactobacillus casei*”, juntamente com *Lactobacillus casei* e *Lactobacillus zaeae*. Eles são micro-organismos facultativamente heterofermentativos que apresentam elevada similaridade quanto as exigências nutricionais e comportamento fisiológico, multiplicando-se em condições ambientais semelhantes (Buriti e Saad, 2007). Estas bactérias são de ampla utilização em queijos e, quando viáveis em número suficiente, podem promover benefícios à saúde do consumidor (Phillips *et al.* , 2006, Kristo *et al.* , 2003). Além disso, também estão associadas a melhoria de aroma e sabor dos queijos (Buriti *et al.* , 2005; El Soda *et al.* , 2000).

Lactobacillus brevis, por sua vez, são micro-organismos obrigatoriamente heterofermentativos (Buriti e Saad, 2007), envolvidos na produção de enzimas do sistema proteolítico, como aminopeptidases, importantes na formação de peptídeos e aminoácidos livres que atuam direta ou indiretamente, no aroma e sabor dos produtos (Nandan *et al.* , 2010). Algumas cepas têm sido consideradas promissoras quanto a ação probiótica em produtos lácteos, por apresentarem boa aderência, *in vitro*, a células epiteliais humanas intestinais e por serem tolerantes a baixo pH, ácidos biliares e fluido pancreático quanto testadas *in vitro* (Rönkä *et al.* , 2003). *Lactobacillus brevis* isolados de queijos tradicionais iranianos foram capazes de reduzir ($p < 0,001$) a inflamação e aumentar de forma significativa, a cicatrização de feridas em modelo murino tratado com este micro-organismo (Zahedi *et al.* , 2011). Uma vez presente no soro-fermento, como mostra a tabela 16, *Lactobacillus brevis* pode contaminar o queijo Minas artesanal, proporcionando as características desejáveis acima citadas. Estudos adicionais devem, portanto, ser conduzidos com esta amostra para conhecimento do seu papel no QMA.

Lactococcus garvieae tem sido considerado um micro-organismo comum da microbiota autóctone de produtos elaborados a partir de leite cru (Fortina *et al.* , 2007; Alegría *et al.* , 2009). Seu isolamento a partir de diferentes fontes, sendo as cepas isoladas geneticamente relacionadas, sugere que este micro-organismo é capaz de se adaptar a diferentes condições de crescimento (Foschino *et al.* , 2008). Embora alguns estudos apontem *Lactococcus garvieae* como agente patógeno de peixes e causador de mastite subclínica nos animais, não é comum sua associação com a produção de fatores de virulência em produtos lácteos (Eyngor *et al.* , 2004; Teixeira *et al.* , 1996). Portanto, a presença de *Lactococcus garvieae* em queijos artesanais não representa um risco a saúde do consumidor. Além disso, apresentam características tecnológicas, como moderada acidificação e atividade proteolítica que são desejáveis ao produto para o desenvolvimento de sabor característico ao queijos maturados, como demonstra estudo realizado com *Lactococcus garvieae* em queijos artesanais italianos (Fortina *et al.* , 2007). Em queijo Casí, tradicional produto espanhol, *Lactococcus garvieae* foi predominante no queijo com três dias de produção. Os autores sugerem o papel desta espécie como principal agente envolvido no processo de acidificação do queijo (Alegría *et al.* , 2009).

Aerococcus viridans foi isolado de amostra de soro-fermento apenas no período da seca. Não há relatos na literatura a respeito da presença deste micro-organismo em soro-fermento usado na elaboração de queijos Minas artesanais. Em trabalho realizado na Serra da Canastra, *Aerococcus viridans* foi erroneamente identificado, por meio de provas bioquímicas enzimáticas e de fermentação de açúcares, em soro-fermento. Após realização de PCR, as amostras presuntivas de *Aerococcus viridans* foram confirmados como sendo pertencentes ao gênero *Enterococcus*

spp., reforçando o questionamento acerca do uso de provas bioquímicas como método de identificação dos micro-organismos, quanto ao gênero e espécie (Araújo, 2008).

Aerococcus viridans é um micro-organismo aeróbio, coco Gram positivo e catalase negativo. É pertencente ao grupo de BAL, da família *Aerococcaceae* e apresenta perfil fenotípico semelhante a *Enterococcus* spp. A diferença entre os micro-organismos é verificada pelo arranjo morfológico. *Enterococcus* spp. dispõe suas células em cocos isolados, em pares ou em cadeias, enquanto *Aerococcus* spp. se apresentam em tetrade (Zhang e Cai, 2014). De fato, nas observações das lâminas de Gram, neste estudo, foi observado o arranjo de cocos em tetrade do isolado de *Aerococcus viridans* (informação pessoal).

Aerococcus viridans tem sido frequentemente associado a diferentes casos de infecção humana, como endocardite, artrite, meningite e problemas no trato urinário (Nathavitharana *et al.* , 1983; Facklam e Elliot, 1995; Gopalachar *et al.* , 2004; Popescu *et al.* , 2005). E não é incomum o seu isolamento em amostras de leite cru, como agente causador de mastite subclínica nas vacas (Devriese *et al.* , 1999; Herlekar *et al.* , 2013). A exemplo do exposto, uma amostra de *Aerococcus viridans*, à semelhança do presente estudo, foi obtido de leite cru usado na elaboração do queijo artesanal Saint-Nectaire (Delbe's *et al.* , 2007). De forma semelhante, *Aerococcus viridans* foi isolado de amostras de leite cru obtidas de propriedades rurais em Savoie and Haute-Savoie, na França (Verdier-Metz *et al.* , 2009). Em queijos artesanais croatas, elaborados a partir de leite cru de ovelha, *Aerococcus viridans* foi isolado em baixas proporções, o correspondente a 0,65% do total de micro-organismos pesquisados (Fuka *et al.* , 2013).

Embora estudos a respeito dos benefícios relacionados a presença de *Aerococcus viridans* em alimentos sejam escassos, alguns relatos na literatura apontam um potencial probiótico deste micro-organismo, ainda que seja necessário testá-lo *in vivo*. Em pesquisa realizada com leite de camela, no Egito, *Aerococcus viridans* apresentou alta atividade antagonista, *in vitro*, frente a *Salmonella* Typhi ATCC 14028, *E. coli* ATCC 25922 e *Vibrio fluvialis* (Hamed e Elattar, 2013). Em outro estudo realizado em alimentos cozidos, *Aerococcus viridans* foi caracterizado como bactéria ácido-lática termotolerante e apresentou resistência, *in vitro*, a suco gástrico artificial, aos sais biliares e ao ácido taurocólico. Além disso, *Aerococcus viridans* apresentou, em relação as outras BAL testadas, entre elas *Enterococcus faecium* e *Lactobacillus plantarum*, maior porcentagem de autoagregação (Ramirez-Chavarin *et al.* , 2013). Esta alta capacidade de autoagregação sugere que este micro-organismo possa ser eficiente na formação de biofilmes e/ou na colonização intestinal, características desejáveis a formação de uma barreira de proteção contra a colonização por micro-organismos patogênicos (Schachtsiek *et al.* , 2004; Schellenberg *et al.* , 2006). Esta proteção ocorre, sobretudo, pela produção intensa de substâncias inibitórias aos patógenos (Del Re *et al.* , 2000).

Duas amostras de *Leuconostoc mesenteroides* foram isoladas de amostra de soro-fermento no período de seca. A presença de *Leuconostoc mesenteroides* em queijos elaborados a partir de leite cru tem sido comumente documentada nas literaturas nacionais e internacionais (Centeno *et al.* , 1996; Arizcum *et al.* , 1997; Perez *et al.* , 2003; Carvalho *et al.* , 2005; Randazzo *et al.* , 2006; Abriouel *et al.* , 2008; Lima *et al.* , 2009; Renye Jr. *et al.* , 2011; Feutry *et al.* , 2012; Nóbrega, 2012). Por outro lado, pouca informação se tem a respeito do isolamento de *Leuconostoc mesenteroides* a partir de amostras de soro-fermento utilizado na elaboração de queijos artesanais.

Há relatos na literatura da presença de *Leuconostoc mesenteroides* em fermento natural usado na elaboração de queijo Mozzarella (Coppola *et al.*., 1988) e em soro-fermento (pingo) usado na produção de queijo Minas artesanal da região do Serro (Chaves *et al.*., 1995). Neste último trabalho, os autores sugeriram que o alto teor de sal encontrado nas amostras de soro-fermento da região do Serro seria responsável pela baixa frequência de isolamento de *Leuconostoc mesenteroides*, à semelhança do presente trabalho (tabela 16). É importante salientar que em ambos os trabalhos citados a identificação deste micro-organismo foi realizada por métodos fenotípicos e bioquímicos, que podem gerar resultados pouco confiáveis, como já discutidos anteriormente.

Leuconostoc mesenteroides tem sido empregado como cultura iniciadora em queijos por propiciar efeitos sensoriais desejáveis ao produto final. Parte destes efeitos advém da produção de compostos, a partir da utilização do citrato, como, acetaldeído, diacetil e acetoina. Além disso, estes micro-organismos são responsáveis pela produção de dextranos, a partir de sacarose, e enzimas lipolíticas e proteolíticas que atuam no desenvolvimento do sabor, aroma, textura e cor dos queijos (Nieto Arribas *et al.*., 2010). No entanto, algumas espécies de *Leuconostoc mesenteroides* também podem induzir a deterioração no queijo através da produção de amins biogênicas (González de Llano *et al.*., 1998;. Fernández-Garcia *et al.*., 2000). Adicionalmente às propriedades tecnológicas propiciadas por algumas cepas de *Leuconostoc mesenteroides*, pesquisas têm revelado potencial probiótico deste micro-organismo quando testado *in vitro*. Entre as características probióticas apresentadas por algumas cepas estão: resistência a sais biliares, capacidade de desconjugação de sais biliares, autoagregação, propriedades de adesão, atividade β -galactosidase, viabilidade em leite fermentado durante o armazenamento, produção de bacteriocinas e sensibilidade a antimicrobianos de importância na medicina humana e medicina veterinária (Stiles, 1994; Abriouel *et al.*., 2008; Paula *et al.*., 2014).

Desta forma, *Leuconostoc mesenteroides* obtidos das amostras de soro-fermento (tabela 16), uma vez presentes no queijo, poderiam exercer efeitos benéficos à saúde do consumidor de QMA, além de conferirem características sensoriais peculiares ao produto final. Assim, pesquisas futuras que testem as possíveis propriedades benéficas *in vitro* e *in vivo* deste micro-organismo se fazem necessárias.

6. CONCLUSÕES

Os períodos de seca e chuva alteraram valores de parâmetros microbiológicos analisados em água, soro-fermento e leite cru, em relação aos micro-organismos patogênicos e deteriorantes pesquisados. Com menor intensidade, também foram responsáveis por diferença nos valores de parâmetros físico-químicos da água, de leite cru e queijo Minas artesanal fresco. Contudo, a maior influência do período do ano foi em relação aos valores de parâmetros microbiológicos de qualidade de queijo Minas artesanal fresco de Campo das Vertentes, que foram mais elevados no período da chuva.

Há presença de manipuladores portadores de *Staphylococcus* coagulase positivo nas mãos, nas propriedades amostradas. Este fato pode ter contribuído para o aumento da contagem deste micro-organismo no queijo.

Os queijos Minas artesanais frescos coletados de propriedades não cadastradas no Instituto Mineiro de Agropecuária foram classificados como queijos de alta e muito alta umidade, nos períodos de chuva e seca, respectivamente.

A água de abastecimento das queijarias amostradas, bem como o leite cru e soro-fermento usados na elaboração do queijo apresentaram altas contagens bacterianas, sendo assim, fontes de contaminação direta ao queijo Minas artesanal fresco.

Como esperado, os queijos Minas artesanais frescos coletados de propriedades não cadastradas no IMA da região de Campo das Vertentes estavam, em sua grande maioria, em desacordo com os parâmetros presentes nas legislações federais e estaduais, tendo em vista que estas não são específicas para queijos frescos elaborados a partir de leite cru e soro-fermento.

As bactérias ácido-láticas foram a microbiota dominante no leite, soro-fermento e queijo Minas artesanal fresco de Campo das Vertentes. *Staphylococcus* coagulase positivo e coliformes, a 30°C e a 45°C, foram os micro-organismos subdominantes.

O queijo e o soro-fermento apresentaram maior diversidade de bactérias ácido-láticas quando comparados com o leite cru e a água. Dentre as amostras identificadas por biologia molecular, *Enterococcus faecalis* foi a espécie com frequência mais elevada nas amostras de leite, soro-fermento e queijo, seguida por *Lactococcus lactis* e *Lactobacillus plantarum*.

Enterococcus durans, *Enterococcus pseudoavium*, *Aerococcus viridans* e *Lactobacillus brevis* foram isolados de soro-fermento utilizado na elaboração de queijo Minas artesanal fresco, o que provavelmente constitui a primeira descrição desses micro-organismos neste tipo de matéria-prima, no Brasil.

7. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados obtidos neste estudo reforçam a importância da aplicação de boas práticas agropecuárias e de fabricação na obtenção de matérias-primas de qualidade para a elaboração do queijo Minas artesanal. Adicionalmente, enfatizam o risco microbiológico associado ao consumo deste tipo de produto fresco, elaborado a partir de leite cru. Neste sentido, fica evidente o papel da maturação como etapa imprescindível na produção do queijo Minas artesanal, para a garantia de seu consumo.

Novas pesquisas são, portanto, necessárias na região de Campo das Vertentes, para o conhecimento das características microbiológicas e físico-químicas dos queijos produzidos. Este seria, então, o primeiro passo para a definição do período de maturação ideal para que o queijo Minas artesanal da região se adeque aos pressupostos de um alimento seguro.

Atenção especial deve ser dada as bactérias ácido-láticas isoladas das amostras de água, leite cru, soro-fermento e queijo Minas artesanal fresco da região de Campo das Vertentes, visto que estas são as grandes responsáveis pelas características sensoriais do produto e podem estar associadas a proteção contra patógenos desejada neste queijo. Sendo assim, estudos que conduzam a caracterização probiótica destes isolados se fazem necessários, tanto para a formação de um banco de dados que permita a utilização futura destas bactérias como cultura endógena probiótica, quanto para a formação da identidade microbiológica do queijo Minas artesanal.

Durante e após as visitas as propriedades não cadastradas, dois proprietários, produtores de queijo Minas artesanal, em Campo das Vertentes, obtiveram o cadastramento de suas produções junto ao Instituto Mineiro de Agropecuária. Parte deste alcance ocorreu pelas orientações feitas a cada um desses produtores, baseadas nos resultados microbiológicos e físico-químicos das amostras coletadas, em relação as práticas a serem adotadas na obtenção de um produto final de qualidade. Este fato reforça a importância do trabalho de extensão das universidades e institutos de pesquisa, junto aos produtores, na busca pela legalização e certificação de qualidade do queijo Minas artesanal produzido no estado. Este trabalho conjunto é, portanto, fundamental para que se estabeleçam as ações que levem a uma denominação de origem protegida para este queijo.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABRIOUEL, H.; MARTÍN-PLATERO, A.; MAQUEDA, M. *et al* . Biodiversity of the microbial community in a Spanish farmhouse cheese as revealed by culture-dependent and culture-independent methods. *Int. J. Food Microbiol.* v.127, n.3, p.200-8, 2008.
- ACURCIO, L. B.; SOUZA, M. R.; NUNES, A. C. *et al* . Isolation, enumeration, molecular identification and probiotic potential evaluation of lactic acid bacteria isolated from sheep milk. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v.66, n.3, p.940-948, 2014.
- ALBUQUERQUE, L. C. (Ed.). *Queijos no Brasil*. Juiz de Fora: EPAMIG, 1986. 162 p.
- ALEGRÍA, Á.; ÁLVAREZ-MARTÍN, P.; SACRISTÁN, N. *et al* . Diversity and evolution of the microbial populations during manufacture and ripening of Casín, a traditional Spanish, starter-free cheese made from cow's milk. *Int. J. Food Microbiol.* v.136,n.1, p.44–51, 2009.
- ALEXANDRE, D. P.; SILVA, M. R.; SOUZA, M. R. *et al* . Atividade antimicrobiana de bactérias lácticas isoladas de queijo-de-minas artesanal do Serro (MG) frente a microrganismos indicadores. *Arq. Bras. Med. Vet.Zootec.*, v.54, n.4, p. 424-428, 2002.
- ALMEIDA, A. C.; DINIZ, T. T.; SOUZA, M. R. *et al* . Caracterização da produção de queijo artesanal na região de Montes Claros, Norte de Minas Gerais. *Acta Vet. Brasilica.* v.6, n.4, p.312-320, 2012.
- ALMEIDA, R. C. *Caracterização bioquímica e genética de bactérias lácticas isoladas de queijo Serrano*. 2007. 68f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia)_ Universidades de Caxias do Sul, Caxias do Sul, RS.
- ALMEIDA FILHO, E. S.; NADER FILHO, A.; Ocorrência de *Staphylococcus aureus* em queijo tipo frescal. *Rev. Saúde Públ.* v. 34, n. 6, p.578-80, 2000.
- AMARAL, L. A.; JÚNIOR, O. D. R.; NADER FILHO, A. *et al* . Água utilizada em estabelecimentos que comercializam produtos cárneos, na cidade de Jaboticabal/SP, como via de contaminação dos alimentos. *Revista Brasileira de Ciência Veterinária*, v.14, n.1, p. 3-6, 2007.
- AMBADOYIANNIS, G.; HATZIKAMARI, M.; LITOPOULOU-TZANETAKI, E. *et al* . Probiotic and technological properties of *Enterococci* isolates from infants and cheese. *Food Biotechnol.*, v.18, n.3, p.307-325, 2005.
- ANDRADE, C. R. G. *Propriedades probióticas in vitro de Lactobacillus spp. isolados de queijos Minas artesanais da Serra da Canastra – MG*. 2012. 57f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.
- ANDRIGHETTO, C.; KNIJFF, E.; LOMBARDI, A. *et al* . Phenotypic and genetic diversity of enterococci isolated from Italian cheeses. *J. Dairy Res.* v.68, n.2, p. 303-316, 2001.
- ARAÚJO, J. M. A. Conservantes químicos de alimentos. *Bol. Soc. Bras. Ciênc. Tecnol. Aliment.* v.24, n.3/4, p.192-210, 1990.

ARAÚJO, R. A. B. M. *Diagnóstico socioeconômico, cultural e avaliação dos parâmetros físico-químicos e microbiológicos do queijo Minas artesanal da região de Araxá*. 2004. 121 f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG.

ARAÚJO, T. F. *Caracterização e identificação de Enterococcus spp. isolados de fermento endógeno utilizado na fabricação do queijo Minas artesanal da região da Canastra, Minas Gerais*. 2008. 74 p. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa.

ARIZCUM, C.; BARCINA, Y.; TORRE, P. Identification and characterization of proteolytic activity of *Enterococcus* spp. Isolated from milk and Roncal and Idiazabal cheese. *Int. J. Food Microbiol.*, v. 38,n.1, p. 17-24, 1997.

ASSOCIAÇÃO Brasileira de Indústrias de Queijo (ABIQ). Desempenho nacional, a produção e o consumo de queijos em Minas Gerais cresceu a um ritmo de 8% ao ano, 2014. Disponível em <http://www.abiq.com.br/abiq_noticias_ler.asp?codigo=1561&codigo_categoria=6&codigo_subcategoria=6>. Acessado em: 10 dez. 2014.

ASSOCIAÇÃO Brasileira de Indústrias de Queijo (ABIQ). Produção de queijos no Brasil deve ultrapassar 1,0 milhão de toneladas em 2013, 2012. Disponível em: <<http://www.scotconsultoria.com.br/noticias/artigos/28592/producao-de-queijos-no-brasil-deve-ultrapassar-10-milhao-de-toneladas-em-2013.htm>>. Acessado em: 10. Dez. 2014.

AXELSSON, L. Lactic acid bacteria: classification and physiology. In: SALMINEN, S., WRIGHT, A., OUWEHAND, A. (Eds.). *Lactic acid bacteria: microbiological and functional aspects*. 3. ed. New York: Marcel Dekker; 2004. p.1-66.

AZEVEDO, A. C.; BARROS, J. J. C.; ROSSI, D. A. Análise microbiológica de queijos Minas artesanais como critério final de avaliação para certificação. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MEDICINA VETERINÁRIA – CONBRAVET, 31., 2004, São Luís. *Anais...* São Luís: Sociedade de Medicina Veterinária do Maranhão – SOMEVETMA, 2004.

BASTOS, M. S. R.; FEITOSA, T.; BORGES, M. F. *et al*. Avaliação microbiológica das mãos de manipuladores de polpa de frutas congelada. *Hig. Aliment.* v.16, n.94, p.55-57, 2002.

BATDORJ, B.; DALGALARRONDO, M.; CHOISET, Y. *et al*. Purification and characterization of two bacteriocins produced by lactic acid bacteria isolated from Mongolian airag. *J. Appl. Microbiol.* v.101, n.4, p.837-848, 2006.

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.

BERESFORD, T. P.; FITZSIMONS, N. A.; BRENNAN, N. L. *et al*. Recent advances in cheese microbiology. *Int. Dairy J.* v.11, n. 4, p.259-274, 2001.

BERTOLINO, M.; DOLCI, P.; GIORDANO, M. *et al*. Evolution of chemico-physical characteristics during manufacturing and ripening of Castelmagno cheese in wintertime. *Food Chem.* v. 129, n. 3, p. 1001-1011, 2011.

- BERTONI, G.; CALAMARI, L.; MAIANTI, M. G. Producing specific milks for speciality cheeses. *Proc. Nutr. Soc.* v. 60, n. 2, p. 231-46, 2001.
- BORELLI, B. M. *Caracterização das bactérias lácticas, leveduras e das populações de Staphylococcus enterotoxigênicos durante a fabricação do queijo Minas curado produzido na Serra da Canastra – MG.* 2006. 120f. Tese (Doutorado em Microbiologia) - Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG.
- BORELLI, B. M. *Quantificação dos indicadores higiênico-sanitários e da diversidade de leveduras durante a fabricação do queijo Minas curado da Serra da Canastra - MG.* 2002. 109f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) - Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG.
- BORELLI, B. M.; FERREIRA, E. G.; LACERDA, I. C. A. *et al* . Enterotoxigenic *Staphylococcus* spp. and other microbial contaminants during production of Canastra cheese. *Brazilian J. Microbiol.* v. 37, n. 4, p. 545-550, 2006a.
- BORELLI, B. M.; FERREIRA, E. G.; LACERDA, I. C. A. *et al* . Yeast populations associated with the artisanal cheese produced in the region of Serra da Canastra, Brazil. *World J. Microb. Biot.* v. 22, n. 11, p. 1115-1119, 2006b.
- BORGES, M. F.; BRANDÃO, S. C. C.; PINHEIRO, A. J. R. Sobrevivência de *Salmonella* em queijo Minas padronizado durante a maturação. *Rev. Microbiol.* v. 20, n. 3, p. 276-281, 1990.
- BORGES, M. F.; NASSU, R. T.; PEREIRA, J. L. *et al* . Perfil da contaminação por estafilococos e suas enterotoxinas e monitorização das condições de higiene em uma linha de produção de queijo de coalho. *Cienc. Rural*, v.38, n.5, p.1434-1438, 2008.
- BOUROUNI, O. C.; EL BOUR, M.; CALO-MATA, P. *et al* . Phylogenetic analysis of antimicrobial lactic acid bacteria from farmed seabass *Dicentrarchus labrax*. *Can. J. Microbiol.* v.58, n.4, p.463–474, 2012.
- BRANT, L. M. F.; FONSECA, L. M.; SILVA, M. C. C. Avaliação da qualidade microbiológica do queijo-de-minas artesanal do Serro-MG. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.* v.59, n.6, p.1570-1574, 2007.
- BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução - RDC nº 12 de 02 de janeiro de 2001. *Aprova o regulamento técnico sobre padrões microbiológicos para alimentos.* Brasília: Agência Nacional de Vigilância Sanitária, 2001. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/legis/resol/_12_01rdc.html> Acessado em: 13 nov. 2014.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Gabinete do Ministro. Portaria nº 366 de 04 mai. 2012. *Diário Oficial da República Federativa do Brasil*, Brasília, DF, 07 mai. 2012a. Seção 1, p 3.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 30, de 7 ago. 2013. *Diário Oficial da União*, Brasília, DF, 08 Ago. 2013. Seção 1, p. 19.
- 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. Instrução Normativa nº 62 de 26 de agosto de 2003. Oficializa os métodos analíticos oficiais para análises microbiológicas para controle de produtos de origem animal e água. Brasília: Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, 2003. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/>>. Acessado em 20 dez. 2014.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 68 de 12 de dezembro de 2006. Oficializa os métodos analíticos oficiais físico-químicos para controle de leite e produtos lácteos. Brasília: Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, 2006. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/>>. Acessado em 20 dez. 2014.

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. Portaria nº 368, de 04 de setembro de 1997. Aprova o regulamento técnico sobre as condições higiênico-sanitárias e de boas práticas de fabricação para estabelecimentos elaboradores/industrializadores de alimentos. *Diário Oficial da República Federativa do Brasil*, Brasília, DF, 08 set. 1997a. Seção 1, p. 19697.

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: 10 dez. 2014.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. Regulamento da Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal. Aprovado pelo decreto nº 30690, de 20 de março de 1952. Brasília, 1952.

BRASIL. Ministério da Saúde. Gabinete do Ministro. Portaria n. 2.914, de 12 de dezembro de 2011. Dispõe sobre 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, 04 de janeiro de 2012b, p. 43-49.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância Sanitária. Portaria SVS/MS nº 326, de 30 de julho de 1997. Aprova o regulamento técnico sobre as condições higiênico-sanitárias e de boas práticas de fabricação para estabelecimentos produtores/industrializadores de alimentos. *Diário Oficial da República Federativa do Brasil*, Brasília, DF, 01 ago. 1997b, Seção 1.

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

BRUNO, L. M.; CARVALHO, J. D. G. *Microbiota láctica de queijos artesanais*. Fortaleza: Embrapa Agroindústria Tropical, 2009. 30p.

BUENO V. F. F.; MESQUITA A. J.; NICOLAU E. S. *et al* . Contagem celular somática: relação com a composição centesimal do leite e período do ano no Estado de Goiás. *Cienc Rural.* v.35, n.4, p. 848-54, 2005.

BURITI, F.C.A.; ROCHA J.S.; ASSIS E. G. *et al* . Probiotic potential of Minas fresh cheese prepared with the addition of *Lactobacillus paracasei*. *LWT-Food Sci Technol.* v.38, n.2, p.173- 180, 2005.

BURITI, F.C.A.; SAAD, S. M. I. Bactérias do grupo *Lactobacillus casei*: caracterização, viabilidade como probióticos em alimentos e sua importância para a saúde humana. *Arch. Latinoam. Nutr.*,v.57, n.4, p. 373-380, 2007.

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.

CARVALHO, J. D. G.; BRUNO, L. M.; NASSU, R. T. *et al* . Bactérias ácido lácticas isoladas de queijos de coalho artesanais comercializados em Fortaleza, CE. In: CONGRESSO NACIONAL DE LATICÍNIOS. 22., 2005, Juiz de Fora, MG. *Anais...* Juiz de Fora: CT/ILCT – EPAMIG, 2005. CD ROM.

CAVALCANTE, J. F.; ANDRADE, N. J.; FURTADO, M. M. *et al* . Processamento do queijo coalho regional empregando leite pasteurizado e cultura láctica endógena. *Cienc.Tecnol.Alimen.* Campinas, v. 27, n. 1, p. 205-214, 2007.

CECCHI, H. M. *Fundamentos teóricos e práticos em análise de alimentos*. 2. ed. Campinas, SP: Editora da Unicamp, 2003.

CENTENO, J. A.; MENÉNDEZ, S.; RODRÍGUEZ-OTERO, J. L. Main microbial flora present as natural starters in Cebreiro raw cow's-milk cheese (northwest Spain). *Int. J. Food. Microbiol.* v.33, n. 2-3, p. 307-13, 1996.

CETINKAYA, Y.; FALK, P; MAYHALL, C. G. Vancomycin-resistant enterococci. *Clin. Microbiol. Rev.* v.13, n.4, p. 686–707, 2000.

CHAVES, A. H. ; PINHEIRO, A. J. R. ; TEIXEIRA, M. A. . Isolamento, Caracterização e Identificação de Bactérias do Gênero *Leuconostoc*. *Rev. Inst. Latic. Cândido Tostes*, v.50, n.3, p.35-41, 1995.

CHOISY, C.; DESMAZEAUD, M.; GRIPON, J.C. *et al* . Microbiological aspects of ripening. In: Eck, A (Ed.), *Cheesemaking: science and technology*, New York, Paris; Lavoisier Publishing Inc, 1987. pp. 259-292.

CHUVA acumulada mensal x N° de dias com chuva-Barbacena (MG)- Para o Ano:2013. 2013 Disponível em < <http://www.inmet.gov.br/portal/index.php?r=tempo/graficos>>. Acessado em 10 dez. 2014.

CHUVA acumulada mensal x N° de dias com chuva-Barbacena (MG)- Para o Ano:2014 até 22/12/2014. 2014. Disponível em < <http://www.inmet.gov.br/portal/index.php?r=tempo/graficos> >. Acessado em 10 dez. 2014.

COLMAN, G.; EFSTRATION, A.; MORRISON, D. Streptococci and related organisms. In: BOARD, R.G.; JONES, D., SKINNER, F.A. (Eds.), *Identification methods in applied and environmental microbiology*. London: Blackwell Scientific Publications, 1992 , p. 221–249.

- COPPOLA, S.; FUSCO, V.; ANDOLFI, R. *et al* . Evaluation of microbial diversity during the manufacture of Fior di Latte di Agerola, a traditional raw milk pasta-filata cheese of the Naples área. *J.Dairy.Res.* v. 73, n. 3, p. 264-272, 2006.
- COPPOLA, S.; PARENTE, E.; DUMONTET, S. *et al* . The microflora of natural whey cultures utilized as starters in the manufacture of Mozzarella cheese from water-buffalo milk. *Le Lait.* v.68, n.3, p.295-309, 1988
- COSTA JÚNIOR, L. C. G.; COSTA, R. G. B.; MAGALHÃES, F. A. R. *et al* . Variações na composição de queijo Minas artesanal da Serra da Canastra nas quatro estações do ano. *Rev. Inst. Latic. Cândido Tostes.*, v. 371, n. 64, p. 13-20, 2009.
- 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. Latic. Cândido. Tostes.* v. 69, n. 2, p. 111-120,2014.
- COSTA, F.M.A.; D’ALESSANDRO, W. T.; CARVALHO, A. L. *et al* . Variação do teor de gordura no leite bovino cru. *Pesq. Agropec. Bras.* v.27, n.5, p.763-769, 1992.
- COSTA, H. H. S. *Potencial probiótico de Lactobacillus spp. e Weissella paramesenteroides isolados de queijo Minas artesanal da Serra da Canastra.* 2010. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Escola de Veterinária. Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG.
- COSTA. D. A.; REINEMANN, D. J. Surveys of milking characteristics and milk quality of Brazilian Dairy Cows. In: Proceedings PANAMERICAN CONGRESS ON MILK QUALITY AND MASTITIS CONTROL, 2 ed., Ribeirão Preto,SP, Brazil, 2002. 156p.
- DAHL, S.; TAVARIA, F. K.; MALCATA, F. X. Relationships between flavor and microbiological profiles in Serra Estrela cheese throughout ripening. *Int. Dairy J.*, v.10, n.4, p.255-262, 2000.
- DALBY, A. 2009. Cheese: A global history. Londres: Reaktion Books, 2009. 154 p.
- D’AMICO, D. J.; DONNELLY, C. W. Microbiological quality of raw milk used for small-scale artisan cheese production in Vermont: effect of farm characteristics and practices. *J. Dairy Sci.* v. 93, n.1, p.134-47, 2010.
- DEBRET, J. B. Viagem pitoresca e história ao Brasil. São Paulo/Belo Horizonte: Edusp/Itatiaia, 1976.
- DEL RE, B.; SGORBATI, B.; MIGLIOLI, M. *et al* . Adhesión, autoaggregation and hydrophobicity of 13 strains of *Bifidobacterium longum*. *Lett. Appl. Microbiol.*, v.31, n.6, p.438-442, 2000.
- DELBE`S, C.; ALI-MANDJEE, L.; MONTEL, M-C. Monitoring bacterial communities in raw milk and cheese by culture-dependent and -independent 16S Rrna gene-based analyses. *Appl. Environ. Microbiol.* p. 1882–1891, 2007.
- DEVRIESE, L. A.; HOMMEZ J.; LAEVENS, H. *et al* . Identification of aesculin-hydrolyzing streptococci, lactococci, aerococci, and enterococci from subclinical intramammary infections in dairy cows. *Vet. Microbiol.*, v.70, n. 1-2, p.87–94, 1999.

- DOLCI, P.; ALESSANDRIA, K.; RANTSIOU, M. *et al* . Microbial diversity, dynamics and activity throughout manufacturing and ripening of Castelmagno PDO cheese. *Int. J. Food Microbiol.* v.143, n. 1-2, p.71–75, 2010.
- DOLCI, P.; ALESSANDRIA, V.; ZEPPA, G. *et al* . Microbiological characterization of artisanal Raschera PDO cheese: Analysis of its indigenous lactic acid bacteria. *Food Microbiol.* v. 25, n. 2, p. 392-399, 2008.
- DORES, M. T. *Queijo Minas artesanal da Canastra maturado à temperatura ambiente e sob refrigeração*. 2007. 91f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa.
- DORES, M. T.; FERREIRA, C. L. L. F. Queijo Minas artesanal, tradição centenária: ameaças e desafios. *Revista Brasileira de Agropecuária Sustentável (RBAS)*., v.2, n.2., p.26-34, 2012.
- DORES, M. T.; NÓBREGA, J. E.; FERREIRA, C. L. L. F. Room temperature aging to guarantee microbiological safety of Brazilian artisan Canastra cheese. *Food Sci. Technol.*, v. 33, n. 1, p. 180-185, 2013.
- DUARTE, D. A. M.; SCHUCH, D. M .T.; SANTOS, S. B. Pesquisa de *Listeria monocytogenes* e microrganismos indicadores Higiênico-sanitários em queijo de coalho produzido e comercializado no estado de Pernambuco. *Arq. Inst. Biol.*, v.72, n.3, p.297-302, 2005.
- DUSI, G. A.; ASSIS, A. G. O Pólo de excelência como articulador do desenvolvimento sustentável dos segmentos de produção e transformação do leite e derivados. In. A cadeia produtiva do leite na mesorregião Campos das Vertentes de Minas Gerais / Editores, Alziro Vasconcelos Carneiro... [*et al* .], - São João del-Rei: Ed. UFSJ; Juiz de Fora: Embrapa Gado de Leite, 2011. 160p.
- EFSA painel Biohaz (EFSA Panel on Biological Hazards), 2013. Scientific Opinion on the maintenance of the list of QPS biological agents intentionally added to food and feed (2013 update). *EFSA Journal*. v.11, n.11:p -3449,108 p. 2013.
- EL SODA M., MADKOR S. A.; TONG P. S. Adjunct cultures: recent developments and potential significance to the cheese industry. *J. Dairy Sci.*, v.83, n.4, p. 609-619, 2000.
- EL SODA, M.; AHMED, N.; OMRAN, N. *et al* . Isolation, identification and selection of lactic acid bacteria cultures for cheesemaking. *Emir. J. Agric. Sci.* v.15, n.2, p.51-71, 2003.
- EMERY, R. S. Feeding for increased milk protein. *J. Dairy Sci.* v.61, n.6, p.825-828. 1978.
- EMPRESA de Assistência Técnica e Extensão Rural de Minas Gerais (EMATER-MG). Queijo Minas artesanal-Guia técnico para a implantação de boas práticas de fabricação em unidades de produção de Queijo Minas artesanal. Belo Horizonte: EMATER-MG, 2009. 68 p.
- ENNAHAR, S.; AOUDE-WERNER, D.; SOROKINE, O. *et al* . Production of pediocin AcH by *Lactobacillus plantarum* WHE 92 isolated from cheese. *Appl. Environ. Microbiol.*, v.62, n.12, p. 4381–4387, 1996.
- ENNAHAR, S.; ASOU, Y.; ZENDO, T.*et al* . Biochemical and genetic evidence for production of enterocins A and B by *Enterococcus faecium* WHE 81. *Int. J. Food Microbiol.*, v. 70, n. 3, p. 291-301, 2001.

- ESTADO de Minas Gerais- Mesorregiões do IBGE. 2014. Disponível em: <<https://www.mg.gov.br/governomg/portal/c/governomg/conheca-minas/geografia/5669-localizacao-geografica/69547-mesorregioes-e-microrregioes-ibge/5146/5044>>. Acessado em 04 jan. 2015.
- ESTEPAR, J.; SANCHEZ, M. M.; ALONSO, L. *et al* . Biochemical and microbiological characterization of artisanal 'Peñamellera' cheese: analysis of its indigenous lactic acid bacteria. *Int. Dairy J.*, v.9, n.10, p.737-743, 1999.
- EYNGOR, M., ZLOTKIN, A., GHITTINO, C. *et al* . Clonality and diversity of the fish pathogen *Lactococcus garvieae* in Mediterranean countries. *Appl. Environ. Microbiol.*,v.70,n.9, p.5132–5137, 2004.
- FACKLAM, R.; ELLIOTT, J. A. Identification, classification, and clinical relevance of catalase-negative, gram-positive cocci, excluding the streptococci and enterococci. *Clin. Microbiol. Rev.*, v.8,n.4, p.479-495, 1995.
- FADDA, M.E.; MOSSA, V.; PISANO, M.B. *et al* . Occurrence and characterization of yeasts isolated from artisanal Fiore Sardo cheese. *Int J Food Microbiol.* v.95, n.1, p.51-9, 2004.
- FAO. FAO Statistical Yearbook 201-World food and agriculture. Rome:FAO, 2013.
- FEITOSA, T.; BORGES, M. F.; NASSU, R. T. *et al* . Pesquisa de *Salmonella* sp., *Listeria* sp. e microrganismos indicadores higiênico-sanitários em queijos produzidos no estado do Rio Grande do Norte. *Ciênc. Tecnol. Aliment.*, v.23, p.162-165, dez. 2003.
- FERNANDES, R. *Microbiology handbook: Dairy Products*. Surrey: Leatherhead Publishing, 2009. 174p.
- FERNÁNDEZ-GARCÍA, E.; TOMILLO, J.; NÚÑEZ, M. Formation of biogenic amines in raw milk Hispánico cheese manufactured with proteinase and different levels of starter culture. *J. Food Prot.* v.63, n.11, p. 1551–1555, 2000.
- FERREIRA, A. D.; VILJOEN, C. C. Yeasts as adjunct starters in matured Cheddar cheese. *Int. J. Food Microbiol.*, v.86, n.1-2, p.131–140, 2003.
- FEUTRY, F.; ONECA, M.; BERTHIER, F. *et al* . Biodiversity and growth dynamics of lactic acid bacteria in artisanal PDO Ossau-Iraty cheeses made from raw ewe's milk with different starters. *Food Microbiol.*, v. 29, n. 1, p. 33-42, 2012.
- FIGUEROA, G.; NAVARRETE, P.; CARO, M. *et al* . Portación de *Staphylococcus aureus* enterotoxigênicos em manipuladores de alimentos. *Rev. Med. Chile.*, v.130, n.8, p.859-864, 2002.
- FONSECA, C. H. *Avaliação dos pré-requisitos do programa de boas práticas agropecuárias na qualidade higiênico-sanitária do queijo Minas artesanal da região da Serra do Salitre- MG*. 2004. 249 f. Dissertação (Mestrado em Ciências de Alimentos) – Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG.
- FONTÁN, M. C. G.; FRANCO, I.; PRIETO, B. *et al* . Microbiological changes in 'San Simón' cheese throughout ripening and its relationship with physico-chemical parameters. *Food Microbiol.*, v. 18, n. 1, p. 25-33, 2001.

- FONTANELI, R. S. *Fatores que afetam a composição e as características físico-químicas do leite*, 2001. 25 f. Seminário (Mestrado) – Programa de Pós – Graduação em Ciências Veterinárias. Faculdade de Medicina Veterinária. Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre, RS.
- FORSYTHE, S. J. *Microbiologia da segurança alimentar*. Porto Alegre: Artmed, 2002. 424p.
- FORTINA, M. G.; RICCI, G.; FOSCHINO, R. *et al* . Phenotypic typing, technological properties and safety aspects of *Lactococcus garvieae* strains from dairy environments. *J. Appl. Microbiol.*, v.103, n.2, p. 445–453, 2007.
- FOSCHINO, R.; NUCERA, D.; VOLPONI, G. *et al* . Comparison of *Lactococcus garvieae* strains isolated in northern Italy from dairy products and fishes through molecular typing *J. Appl. Microbiol.*, v.105, n.3, p.652–662, 2008.
- FOX, P. F.; MCSWEENEY, P. L. H. Cheese: An overview. In: FOX, P. F.; MCSWEENEY, P. L. H.; COGAN, T. M *et al* (Ed.) *Cheese: chemistry, physics, and microbiology*. 3 ed. London: Elsevier Academic Press, 2004. v.1, Cap. 1, p. 1–18.
- FRANCO, B. D. G. M.; LANDCRAF, U. *Microbiologia dos alimentos*. São Paulo : Atheneu, 2003.
- FREITAS FILHO, J. R.; SOUZA FILHO, J. S.; ARCANJO, H. G. S. *et al* . Avaliação dos parâmetros físico-químicos do queijo coalho artesanal produzido em Calçado-PE. *Revista Brasileira de Tecnologia Agroindustrial*. v.6, n.1, p. 722-729, 2012.
- FREITAS, W. C.; TRAVASSOZ, A. E. R.; MACIEL, J. F. Avaliação microbiológica e físico-química de leite cru e queijo de coalho produzidos no estado da Paraíba. *Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais*, v.15, n.1, p.35-42, 2013
- FUKA, M. M.; WALLISCH, S.; ENGEL, M. *et al* . Dynamics of bacterial communities during the ripening process of different croatian cheese types derived from raw ewe’s milk cheeses. *Plus one*. v. 8, I.11, 2013.
- FURTADO, M. M. *A arte e a ciência do queijo*. 2.ed. São Paulo : Globo, 1991. 297p.
- FURTADO, M. M. Queijo do Serro: tradição na história do povo mineiro. *Rev. Inst. Latic. Cândido Tostes.*, v.35, p.33-36, 1980.
- GARDINI, F.; TOFALO, R.; BELLETTI, N. *et al* . Characterization of yeasts involved in the ripening of Pecorino Crotonese cheese. *Food Microbiol.* v.23, n.7, p.641–648, 2006.
- GENEROSO, D.; LANGONI, H. Avaliação da presença de *Salmonella* sp. na criação de bovinos de leite. *Vet. e Zootec.*, v.18, n.4, p. 661-667, 2011.
- GHRAIRI, T.; FRERE, J.; BERJEAUD, J.M. *et al* . Purification and characterisation of bacteriocins produced by *Enterococcus faecium* from Tunisian rigouta cheese. *Food Control.*, v.19, p.162–169, 2008.
- GONZÁLEZ DE LLANO, D.; CUESTA, P.; RODRÍGUEZ, A. Biogenic amine production by wild lactococcal and leuconostoc strains. *Lett. Appl. Microbiol.*, v.26, n.4, p.270–274, 1998.

- GONZÁLEZ, J.; MAS, M.; TABLA, R. *et al* . Autochthonous starter effect on the microbiological, physicochemical and sensorial characteristics of Ibores goat's milk cheeses. *Le Lait.*, v. 83, n. 3, p. 193-202, 2003.
- GOPALACHAR, A.; AKINS, R. L.; DAVIS, W. R. *et al* . Urinary tract infection caused by *Aerococcus viridans*, a case report. *Med. Sci. Monit.*, v.10, n.11, p.CS73–CS75.20, 2004.
- GRANDI, A. Z.; ROSSI, D. A. Qualidade microbiológica do queijo minas frescal comercializado na cidade de Uberlândia-MG. In: ENCONTRO INTERNO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA, 6., 2006, Uberlândia-MG. *Anais*. Uberlândia, 2006.
- GRANDO, W. F.; SCAPIN, D.; MALHEIROS, P. D. *et al* . Suscetibilidade a antimicrobianos de *Staphylococcus aureus* isolados de manipuladores da indústria de laticínios. *Alim. Nutr.*, v. 19, n. 4, p. 467-471, 2008.
- GRAPPIN, R.; BEUVIER, E. Possible Implications of milk pasteurization on the manufacture and sensory quality of ripened cheese. *Int.Dairy J.* v. 7, n. 12, p.751-871, 1997.
- GUEDES NETO, L. G.; SOUZA, M. R.; NUNES, A. C. *et al* . Atividade antimicrobiana de bactérias ácido-lácticas isoladas de queijos de coalho artesanal e industrial frente a microrganismos indicadores. *Arq. Bras.Med. Vet.Zootec.*, v.57, n. 2, p.245-250, 2005.
- GUIDO, E. S.; SILVA, E. D. P.; SILVA, M. C. *et al* . Uma abordagem da extensão universitária na melhoria da qualidade do leite na cadeia produtiva do município de Barbosa Ferraz (Paraná). *B. do CEPPA.*, v. 28, n.2, p. 303-312, 2010.
- HAGI, T. e HOSHINO, T. Screening and characterization of potencial probiotic Acid Lactic Bacteria from cultured common carp intestine. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, v. 73, n.7, p 1479-1483, 2009.
- HAMED,E.; ELATTAR, A. Identification and Some Probiotic Potential of Lactic Acid Bacteria Isolated From Egyptian Camels Milk. *Life Sci. J.*, v.10, n.1, p.1952-1961, 2013.
- HARDING, F. *Milk quality*. New York: Blackie Academic & Professional, 1995, 165 p.
- HARMON, R. J. Physiology of mastitis and factors affecting somatic cell counts. *J. Dairy Sci.*,v.77, n.7, p.2103-2113, 1994.
- HAYES, M. C.; BOOR, K. Raw milk and fluid milk products. In: MARTH, E. H.; STEELE, J. L. (Ed) *Appl. Dairy Microbiol.*, Marcel Dekker: Nova York, 2001. p. 59-76.
- HERLEKAR, D.A.; SHASHIKANT, C.S.; GURJAR, A.A. *et al* . presence of viral and bacterial organisms in milk and their association with somatic cell counts. *J. Dairy Sci.*, v.96, n.10, p.6336–6346, 2013.
- HERMANN, G.; FUNCK, G. D.; SCHMIDT, J. T. *et al* . Isolamento e identificação de bactérias lácticas supostamente bacteriocinogênicas em leite e queijo. *Rev. Acad., Ciênc. Agrár. Ambient.*, v. 11, n. 2, p. 191-196, 2013 .
- HOVE, H.; NORGAARD, H.; MORTENSEN, P. B. Lactic acid bacteria and the human gastrointestinal tract. *Europ. J. Clin. Nutr.*, v.53, n.5, p.339-350, 1999.

HUNT, K.; SCHELIN, J.; RÅDSTRÖM, P. *et al* . Classical enterotoxins of coagulase-positive *Staphylococcus aureus* isolates from raw milk and products for raw milk cheese production in Ireland. *Dairy Sci. e Technol.*, v.92,n.5, p.487–499, 2012.

INNOCENTE, N.; BIASUTTI, M. Automatic milking systems in the Protected Designation of Origin Montasio cheese production chain: effects on milk and cheese quality. *J Dairy Sci.*, v.96, n.2, p.740-51, 2013.

IBGE- INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. Estado de Minas. Meso e microrregiões do IBGE. 2010a. Disponível em: <<http://www.mg.gov.br/governomg/ecp/contents.do?evento=conteudo&idConteudo=69547&chPlc=69547&termos=s&app=governomg&tax=0&taxp=5922>>. Acessado em 02 jan. 2014.

IBGE- INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. Pesquisa pecuária municipal. 2010b. Disponível em: <<http://www.sidra.ibge.gov.br>>. Acessado em 07 dez. 2014.

IBGE- INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. Produção da pecuária Municipal, Rio de Janeiro: IBGE, 2011 v. 39, p.1-63.

IPHAN- INSTITUTO DO PATRIMÔNIO HISTÓRICO E ARTÍSTICO NACIONAL. Livro de Registro de Saberes. Brasília, DF. 2008. v. 1, registro n.4. Disponível em <http://www.iphan.gov.br/bcrE/pages/folProcessoRegistroE.jsf>>. Acessado em: 29 nov. 2014.

INTERNATIONAL Dairy Federation. Milk: enumeration of somatic cell. *IDF Standard 148A*. Bruxelas: IDF, 1995. 8p.

INTERNATIONAL Dairy Federation. Whole milk: determination of milkfat, protein and lactose content. Guidance on the operation midinfrared instruments. *IDF Standard 141C*. Bruxelas: IDF, 2000. 8p.

INTERNATIONAL Dairy Federation. Yogurt: enumeration of characteristic microorganisms colony count technique at 37°C. *IDF Standard 117A*. Brussels: IDF, 1988. 4p.

JAKOBSEN, R. A.; HEGGEBØ, R.; SUNDE, E. B. *et al* . *Staphylococcus aureus* and *Listeria monocytogenes* in Norwegian raw milk cheese Production. *Food Microbiol.* v.28,n.3, p.492-496, 2011.

JAY, J. M; LOESSNER, M. J., GOLDEN, D. D. *Modern food microbiology*. 7. ed. New York: Springer, 2005. 782 p.

JAYARAO, B. M.; DONALDSON, S. C.; STRALEY, B. A. *et al* . A survey of foodborne pathogens in bulk tank milk and raw milk consumption among farm families in Pennsylvania. *J. Dairy Sci.*,v.89, n.7, p.2451-8, 2006.

JAYARAO, B. M.; WOLFGANG, D. R. Bulk tank milk analysis a useful tool for improving milk quality and herd udder. *Veterinary Clinics Food Animal*, v.19, n.1, p.75-92, 2003.

KALLIOPI, R.; COMI, G. COCOLIN, L. The *rpoB* gene as a target for PCR-DGGE analysis to follow lactic acid bacterial population dynamics during food fermentations. *Food Microbiol.* London, v. 21, n. 4, p. 481-487, 2004.

- KAMIYAMA, C. M. *Qualidade da água em laticínios - A realidade da agroindústria participante do programa PROSPERAR/AGROINDÚSTRIA*. 2012. 116 f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia do Leite e Derivados, Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora, MG).
- KITCHEN, B. J. Review of the progress of dairy science: bovine mastitis: milk compositional changes and related diagnostic tests. *J. Dairy Res.*, v.48, n.1, p.167-88, 1981.
- KLIJN, N.; WEERKAMP, A. H.; de VOS, W. M. Detection and characterization of lactose-utilizing *Lactococcus* spp. in natural ecosystems. *Appl. Environ. Micro.*, v. 61, n. 2, p. 788-792, 1995.
- KONEMAN, E. W.; ALLEN, S. D.; JANDA, W. M. *et al* . *Diagnóstico microbiológico: texto e atlas colorido*. 5ed. Rio de Janeiro: Medsi, 2005.
- KONGO, J. M.; GOMES, A. M.; MALCATA, F. X. *et al* . Microbiological, biochemical and compositional changes during ripening of Sao Jorge – a raw milk cheese from the Azores (Portugal). *Food Chem.*, v.112, p.131–138, 2009.
- KRISTO, E.; BILIADERIS, CG.; TZANETAKIS, N. Modelling of rheological, microbiological and acidification properties of a fermented milk product containing a probiotic strain of *Lactobacillus paracasei*. *Int Dairy J.*, v.13, n.7, p.517-528, 2003.
- KWON, H.; YANG, E.; YEON, S. *et al* . Rapid identification of probiotic *Lactobacillus* species by multiplex PCR using species-specific primers based on the region extending from 16S rRNA through 23S rRNA *FEMS Microbiol. Lett.*, v. 239, n. 2, p. 267-275, 2004.
- LANE D. J. 16S/23S rRNA sequencing. In: STACKEBRANDT, E., GOODFELLOW, M. *Nucleic acid techniques in bacterial systematics*. Chichester: Wiley, 1991, p.115-175.
- LANGONI, H.; PINTO, M. P.; DOMINGUES, P. F. *et al* . Etiologia e sensibilidade bacteriana da mastite bovina. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v.43, p.507-15, 1991.
- 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.
- LAW, B. A.; TAMIME, A. Y. *Technology of cheesemaking*. Sussex: Wiley-Blackwell, 2010. 515 p.
- LE LOIR, Y.; BARON, F.; GAUTIER, M. *Staphylococcus aureus* and food poisoning. *Genet. Mol. Res.* v. 2, n. 1, p. 63-76, 2003.
- LEITE, M. O. *Isolamento e seleção de culturas lácticas nacionais resistentes a bacteriófagos para elaboração de queijo Minas curado*. 1993. 64f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa.
- LEMOS, A. M. (Org.). *Caracterização da Região dos Campos das Vertentes como produtora de Queijo Minas Artesanal*. Campos das Vertentes: Secretaria Municipal de Agricultura e Pecuária de São João Del-Rei, 2009. 24p.
- LEMPK, M. W.; PINTO, M. S.; MARTINS, J. M. *et al* . Diagnóstico socioeconômico e cultural dos produtores de queijo Minas artesanal da microrregião de Montes Claros, MG. *Informe Agropecuário*, v. 34, n. 273, p. 99-107, 2013.

- LERICHE, F.; FAYOLLE, K. No seasonal effect on culturable pseudomonads in fresh milks from cattle herds. *J Dairy Sci.*, v. 59, n. 5, p. 2299-2306, 2012.
- LIMA, C.D.L.C.; LIMA, L. A.; CERQUEIRA, M. M. O. P. *et al* . Bactérias do ácido láctico e leveduras associadas com o queijo-de-minas artesanal produzido na região da Serra do Salitre, Minas Gerais. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v. 61, n.1, p. 266-272, 2009.
- LOGUERCIO, A. P.; ALEIXO, J.A.G. Microbiologia de queijo tipo minas frescal produzido artesanalmente. *Ciênc. Rural*, v.31, n.6, 2001.
- LÓPEZ-DÍAZ, T. M.; ALONSO, C.; ROMÁN, C. *et al* . Lactic acid bacteria isolated from a hand-made blue cheese. *Food Microbiol.*, v. 17, n. 1, p. 23-32, 2000.
- LUBECK, G.M.; LARA, J.A. F.; BAGATINI, L. *et al* . Avaliação de algumas características físico-químicas e microbiológicas de algumas marcas de queijo tipo colonial produzido no sudoeste do estado do Paraná. *Rev. Inst. Lat. Cândido Tostes*, v.56, p.185-193, 2001
- MACÊDO, J.A.B. *Métodos laboratoriais de análises físico-químicas e microbiológicas*. 3. ed. Belo Horizonte :Conselho Regional de Química, 2005, 602p.
- MACHADO, E. C.; FERREIRA, C. L. L. F.; FONSECA, L. M. *et al* Características físico-químicas e sensoriais do queijo Minas artesanal produzido na região do Serro, Minas Gerais. *Cienc. Tecnol. Aliment.* v. 24, n. 4, p. 516-521, 2004.
- MACHADO, J. R.; MARSON, J. M.; OLIVEIRA, A. C. S. *et al* . Avaliação microbiológica das mãos e fossas nasais de manipuladores de alimentos da unidade de alimentação e nutrição de um hospital universitário. *Medicina*, v. 42, n. 4, p. 461-465, 2009.
- MACHADO, P. F. *Pagamento do Leite por Qualidade*. In CONGRESSO BRASILEIRO DE QUALIDADE DO LEITE 3., 2008, Recife: CCS Gráfica e Editora, 2008, 373 p.
- MANOLOPOULOU, E.; SARANTINOPOULOS, P.; ZOIDOU, E. *et al* . Evolution of microbial populations during tradicional Feta cheese manufacture and ripening. *Int. J. Food. Microbiol.*, v.82, n.2, p. 153-161, 2003.
- MARTINS E SILVA, A. C. *Impacto da capacitação em boas práticas de fabricação na presença de Staphylococcus aureus e Echerichia coli em mãos e fossas nasais de manipuladores de panificadoras e confeitarias da região central de Goiânia-Goiás*.2009. Dissertação (Mestrado)-Universidade Federal de Goiás, Goiânia, GO.
- MARTINS, A. D. O.; MENDONÇA, R. C. S.; SILVA, D. L. *et al* . Resistência de bactérias lácticas, isoladas de fezes de suínos e sua capacidade antagonica frente a microrganismos indicadores. *Revista de Ciências Agroveterinárias*, v. 5, n. 1, p. 53-59, 2006.
- MARTINS, E. Patrimônio de Minas. *Jornal Estado de Minas*, Belo Horizonte, dez, 2001. Caderno Economia, n. 44, p.14-17.
- MARTINS, J. M. *Características físico-químicas e microbiológicas durante a maturação do queijo Minas artesanal da região do Serro*. 2006. 158 f. Tese (Doutorado em Ciência e Tecnologia de Alimentos). Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG.

- MELICIO, S. P. L.; CARVALHO, M. R. B. C; TONHATI, H. *et al* . Composicao quimica do leite de Bufala da raca Murrah na regio de São Carlos. . *Rev. Inst. Latic. Cândido Tostes.*, v.60, n.346-347, p. 7-12, 2005.
- MELO, B. A.; SANTOS, T. M. C.; BARBOSA. Y, R, S. *et al* . Aspectos microbiológicos de amostras de leite cru coletadas no município de Major Isidoro- Alagoas. *RVADS.* v.5, n.5, p.01-05, 2010.
- MELO, F. D.; DALMINA, K .A.; PEREIRA, M. N. *et al* . Avaliação da inocuidade e qualidade microbiológica do queijo artesanal serrano e sua relação com as variáveis físico químicas e o período de maturação. *Acta Scientiae Veterinariae.* v.41, p.1152, 2013.
- MELVILLE, P. A.; RUZ-PERES, M.; YOKOIA, E. *et al* . Ocorrência de fungos em leite cru proveniente detanques de refrigeração e latões de propriedades leiteiras, bem como de leite comercializado diretamente ao consumidor. *Arq. Inst. Biol.*, v. 73, n. 3, p.295-301, 2006.
- MENDES, M. H .A. F. *Produção higiênica do leite: Boas Práticas Agrícolas.* 2006. 44f. Trabalho de Conclusão do Curso (Especialização Latu Sensu em Higiene e Inspeção de Produtos de Origem Animal)_ Universidade Castelo Branco, Brasília, DF.
- MENESES, J. N. C. *Queijo artesanal de Minas: patrimônio cultural do Brasil.* Dossiê interpretativo. Belo Horizonte: IPHAN, 2006. v. 1. Disponível em: <<http://www.iphan.gov.br>>. Acesso em: 03 set. 2013.
- MENEZES, S.S.M. Queijo de coalho: tradição cultural e estratégia de reprodução social na região Nordeste. *Revista de Geografia (UFPE).* v.28, n.1, p 40-56, 2011.
- MEYER, S. T. O uso de cloro na desinfecção de águas, a formação de trihalometanos e os riscos potenciais à saúde pública. *Cad. Saúde Pública,* v.10, n.1,p.99-110, 1994.
- MILLS, S.; SERRANO, L. M.; GRIFFIN, C. *et al* . Inhibitory activity of Lactobacillus plantarum LMG P-26358 against Listeria innocua when used as an adjunct starter in the manufacture of cheese. *Microbial. Cell Factories.*,v.10, suppl, 1, 2011.
- MINAS GERAIS. ASSEMBLÉIA LEGISLATIVA DO ESTADO DE MINAS GERAIS. Decreto nº 42.645, de 05 de junho de 2002. Aprova o regulamento da Lei nº 14.185, de 31/01/2002, que dispõe sobre o processo de produção de queijo Minas artesanal. *Diário do Executivo.* Minas Gerais, Belo Horizonte, 6 jun. 2002a. p. 18 col. 2. Disponível em: <<http://www.almg.gov.br>>. Acessado em: 05 dez. 2014.
- MINAS GERAIS. ASSEMBLÉIA LEGISLATIVA DO ESTADO DE MINAS GERAIS. Decreto nº 44.864 de 01 de agosto de 2008. *Altera o regulamento da lei nº 14.185 de 31 de janeiro de 2002, que dispõe sobre o processo de produção do queijo de minas artesanal.* *Diário do Executivo.* Minas Gerais, Belo Horizonte, 2 ago. 2008. p. 1 col. 2. Disponível em: <<http://www.almg.gov.br>>. Acessado em: 07 dez. 2014.
- MINAS GERAIS. ASSEMBLÉIA LEGISLATIVA DO ESTADO DE MINAS GERAIS. Lei nº 14.185, de 31 de janeiro de 2002. Dispõe sobre o processo de produção do queijo Minas artesanal e dá outras providências. *Diário do Executivo.* Minas Gerais, Belo Horizonte, 1 fev. 2002b. p. 3 col. 2. Disponível em: <<http://www.almg.gov.br>>. Acessado em: 05 dez. 2014.

MINAS GERAIS. ASSEMBLÉIA LEGISLATIVA DO ESTADO DE MINAS GERAIS. Lei nº 20.549, 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: <<http://www.almg.gov.br/>>. Acessado em: 06 dez. 2014.

MINAS GERAIS. INSTITUTO MINEIRO DE AGROPECUÁRIA. Portaria n. 517 de 14 jun. 2002c. Normas de defesa sanitária para rebanhos fornecedores de leite. Disponível em: <http://www.ima.mg.gov.br/component/docman/doc_details/209-portaria-517> Acessado em: 05 dez. 2014.

MINAS GERAIS. INSTITUTO MINEIRO DE AGROPECUÁRIA. Portaria n. 518 de 14 jun. 2002d. Requisitos básicos de instalações, materiais e equipamentos. Disponível em: <http://www.ima.mg.gov.br/component/docman/doc_details/210-portaria-518> Acessado em: 05 dez. 2014.

MINAS GERAIS. INSTITUTO MINEIRO DE AGROPECUÁRIA- IMA. Portaria nº 523, de 3 de jul. 2002e. Dispõe sobre as condições higiênico-sanitárias e boas práticas na manipulação e fabricação do queijo Minas artesanal. Disponível em: <http://www.ima.mg.gov.br/component/docman/doc_details/212-portaria-523>. Acessado em: 09 dez. 2014.

MINAS GERAIS. INSTITUTO MINEIRO DE AGROPECUÁRIA. Portaria n. 546 de 29 out. 2002f. Identifica a microrregião do Serro. Disponível em: <http://www.ima.mg.gov.br/component/docman/doc_details/242-portaria-591> Acessado em: 05 dez. 2014.

MINAS GERAIS. INSTITUTO MINEIRO DE AGROPECUÁRIA. Portaria n. 594 de 10 jun. 2003a. Identifica a microrregião de Araxá. Disponível em: <http://www.ima.mg.gov.br/component/docman/doc_details/244-portaria-594> Acessado em: 05 dez. 2014.

MINAS GERAIS. INSTITUTO MINEIRO DE AGROPECUÁRIA. Portaria n. 619 de 01 dez. 2003b. Identifica a microrregião do Cerrado. Disponível em: <http://www.ima.mg.gov.br/component/docman/doc_details/256-portaria-619> Acessado em: 05 dez. 2014.

MINAS GERAIS. INSTITUTO MINEIRO DE AGROPECUÁRIA. Portaria n. 694 de 17 nov. 2004. Identifica a microrregião da Canastra. Disponível em: <http://www.ima.mg.gov.br/component/docman/doc_details/276-portaria-694> Acessado em: 05 dez. 2014.

MINAS GERAIS. INSTITUTO MINEIRO DE AGROPECUÁRIA- IMA. Portaria n. 818, de 12 de dezembro de 2006. Baixa o regulamento técnico de produção do Queijo Minas Artesanal e dá outras providências. Disponível em: <http://www.ima.mg.gov.br/component/docman/doc_details/338-portaria-818>. Acessado em: 09 dez. 2014.

MINAS GERAIS. INSTITUTO MINEIRO DE AGROPECUÁRIA- IMA. Portaria n. 1022 de 3 nov. 2009. Identifica a região de Campo das Vertentes. Disponível em: <http://imanet.ima.mg.gov.br/nova/legis/portarias_pdf/1022.pdf>. Acessado em: 05 dez. 2014.

MINAS GERAIS. INSTITUTO MINEIRO DE AGROPECUÁRIA- IMA. Portaria n. 1305, de 30 de abril de 2013a. Estabelece diretrizes para a produção do queijo minas artesanal. Disponível em: <http://www.ima.mg.gov.br/portarias/doc_details/1159-portaria-no-1305-de-30-de-abril-de-2013>. Acessado em: 09 dez. 2014.

MINAS GERAIS. INSTITUTO MINEIRO DE AGROPECUÁRIA- IMA. Portaria n. 1356, de 22 de outubro de 2013b. Dispõe sobre a inclusão de estabelecimentos de produtos de origem animal no sistema brasileiro de inspeção de produtos de origem animal (SISBI/POA). Disponível em: <http://www.ima.mg.gov.br/portarias/doc_details/1245-portaria-no-1356-de-22-de-outubro-de-2013> Acessado em: 09 dez. 2014.

MINAS GERAIS. INSTITUTO MINEIRO DE AGROPECUÁRIA. Portaria nº 1397, de 13 fev. 2014a. Identifica a Microrregião do Triângulo Mineiro como produtora de Queijo Minas Artesanal. Disponível em: <http://www.ima.mg.gov.br/material-curso-cfo-cfoc/doc_details/1315-portaria-no-1397-de-13-de-fevereiro-de-2014> Acessado em: 05 dez. 2014.

MINAS GERAIS. INSTITUTO MINEIRO DE AGROPECUÁRIA. Portaria nº 1428, 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/component/search/?searchword=Queijo+Artesanal&ordering=&searchphrase=all>> Acessado em: 05 dez. 2014.

MODI, R.; HIRVI, Y.; HILL, A. *et al* . Effect of phage on survival of Salmonella enteritidis during manufacture and storage of cheddar cheese made from raw and pasteurized milk. *J. Food Protect.*, v.64, n. 7, p. 927-933, 2001.

MOREIRA, J. L. S.; MOTA, R. M.; HORTA, M.F. *et al* . Identification to the species level of *Lactobacillus* isolated in probiotic prospecting studies of human, animal or food origin by 16S-23S rRNA restriction profiling. *BMC Microbiol.*, v. 5, n. 15, p. 1-9, 2005.

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 Juiz de Fora, Juiz de Fora, MG.

MURRAY, B .E. The Life and Times of the Enterococcus. *Clin. Microbiol. Rev.*, v.3, n.1, p. 46-65, 1990.

NANDAN, A.; GAURAV, A.; PANDEY, A. *et al* . Arginine specific aminopeptidase from *Lactobacillus brevis*. *Braz. Arch. Biol. Technol.* ,v.53 n. 6: p. 1443-1450,2010.

NATHAVITHARANA, K. A., ARSECULERATNE, S. N., APONSO, H. A. *et al* . Acute meningitis in early childhood caused by *Aerococcus viridians*. *Br Med. J. (Clin. Res. Ed.)*.v. 286, n.6373, p. 1248, 1983.

NICOLAU, E. S.; KUAYE, A. Y.; MESQUITA, A. J. *et al* . Avaliação do potencial de produção e tipos de enterotoxinas estafilocócica encontradas em linhagens de Staphylococcus aureus e extratos de amostras de queijo tipo mussarela fabricado na região de Goiânia-GO. *Rev. Inst. Lat. Cândido Tostes*, v.56, p.92-101, 2001.

NIETO-ARRIBAS, P.; SESENA S.; POVEDA J. M. *et al* . Genotypic and technological characterization of *Leuconostoc* isolates to be used as adjunct starters in Manchego cheese manufacture. *Food Microbiol.* v.27,n.1, p.85–93, 2010

NÓBREGA, J. E. *Biodiversidade microbiana, descritores físico-químicos e sensoriais dos queijos artesanais fabricados nas regiões da Serra da Canastra e do Serro, Minas Gerais*. 2012. 115f. Tese (Doutorado em Ciência e Tecnologia de Alimentos- Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG.

NÓBREGA, J. E. *Caracterização do fermento endógeno utilizado na fabricação do queijo Canastra no município de Medeiros, Minas Gerais, com ênfase em leveduras*. 2007. 82 f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG.

NOGUEIRA FILHO, A.; EVANGELISTA, F. R.; PIMENTEL, J. C. M.; *et al* . Sistema agroindustrial do leite no Nordeste. 2. ed. Fortaleza: Banco do Nordeste: Embrapa Agroindústria Tropical, 2006. 159 p.

NOMURA M.; KOBAYASHI M.; NARITA T. *et al*. Phenotypic and molecular characterization of *Lactococcus lactis* from milk and plants. *J.Appl.Microbiol.*, v.101, n.2, p.396–405, 2006.

NORONHA, J. F. Segurança alimentar dos queijos tradicionais. Disponível em: <http://www.esac.pt/noronha/manuais/seguranca_alimentar_queijos.pdf> Acessado em: 10 dez. 2014.

OKURA, M. H. ; RIGOBELLO, E. C. ; ÁVILA, F.A. . Isolamento e identificação de patógenos em leite cru produzido nas microrregiões do Triângulo mineiro, MG. *ARS Veterinária*, v. 21, n.3, p. 324-330, 2005.

OLIVEIRA, D. F.; PORTO, M. A. C.; BRAVO, C. E. C. *et al* . Caracterização físico-química de queijos Minas artesanais produzidos em diferentes microrregiões de Minas Gerais. *Oikos: Revista Brasileira de Economia Doméstica*, v. 24, n.2, p. 185-196, 2013.

OLIVEIRA, D. L. S. *Staphylococcus spp. isolados de queijo artesanal da Serra da Canastra: identificação bioquímica e molecular, detecção de genes para produção de toxinas, susceptibilidade a antimicrobianos e atividade antagonista in vitro frente a Lactobacillus spp.* 2012. 47f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG.

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. 111p. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

OLIVEIRA, V. J. *Da qualidade e organização da produção ao reconhecimento de região produtora de queijo Minas artesanal: análise da experiência dos produtores da região de São João del Rei e seu entorno*. 2010. 198 f. Tese (Doutorado em Ciência dos Alimentos) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

ORNELAS, E. A. *Diagnóstico preliminar para caracterização do processo e das condições de fabricação do queijo artesanal da Serra da Canastra*. 2005. 88f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG.

- ORTALINI, M. B. *Bactérias ácido-láticas autóctones de leite cru e queijo Minas frescal: Isolamento de culturas bacteriocinogênicas, caracterização da atividade antagonista e identificação molecular*. 2009. 123f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária)._Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG.
- ORTEGA, A. C.; BORGES, M. S. Codex Alimentarius: a segurança alimentar sob a ótica da qualidade. *Segurança Alimentar e Nutricional.*, v.19, n. 1,p. 71-81, 2012.
- OUADGHIRI, M.; AMAR, M.; VANCANNEYT, M. *et al* . Biodiversity of lactic acid bacteria in Moroccan soft white cheese (Jben). *Fems Microbial. Let.*, v. 251, n. 2, p. 267-271, 2005.
- PAULA, A. T.; JERONYMO-CENEVIVA, A. B.; SILVA, L. F. *et al* . Leuconostoc mesenteroides SJP55: a potential probiotic strain isolated from Brazilian water buffalo mozzarella cheese. *Probiotics Antimicrob. Proteins.*, v.6, n.3-4, p. 186-97, 2014.
- PEDROSA, F. R. V. Pesquisa de Salmonella spp. em queijos Minas meia-cura obtidos em feiras livres da cidade de São Paulo. 2010. 69p. Dissertação (Mestrado em Ciências)_ Faculdade de Medicina Veterinária. Universidade de São Paulo, São Paulo, SP.
- PEREIRA, M. L; CARMO, L. S.; LARA, M. A. *et al* . Enterotoxigenic *Staphylococci* from food handler working in a industrial kitchen in Belo Horizonte, MG (Brazil). *Rev. Microbiol.*, v.25, n.3, p. 161-165, 1994.
- PEREIRA, R. B. *Caracterização microbiológica de alguns tipos de queijos regionais brasileiros*. 2007. 27f. Monografia (Especialização em Microbiologia do instituto de Ciências Biológicas) – Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG.
- PEREIRA, K. C.; SÁ, O.R.; PEREIRA, K.C. Avaliação da qualidade higiênico-sanitária do queijo Canastra e de sua matéria-prima produzidos na região de São Roque de Minas (MG). *Scientiae et Praxis*, v. 1, n. 2, p. 21-26, 2008.
- PERES, J. R. O leite como ferramenta do monitoramento nutricional. In: USO do leite para monitorar a nutrição e o metabolismo de vacas leiteiras. Porto Alegre: Gráfica de Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2001.
- PEREZ, G.; CARDELL, E.; ZÁRATE, V. Technological characterization of lactic acid bacteria from Tenerife cheese. *Int. J. Food Sci. Tech*, Oxford, v.38, n.5, p.537-546, 2003.
- PERIN, L. M.; MORAES, P. M.; VIÇOSA, G. N. *et al* . Identification of bacteriocinogenic *Lactococcus* isolates from raw milk and cheese capable of producing nisin A and nisin Z. *Int. Dairy J.*,v. 25, n. 1, p. 46-51, 2012.
- PERRY, K. S. P. Queijos: aspectos químicos, bioquímicos e microbiológicos. *Quim.Nova*, v. 27, n. 2, p. 293-300, 2004.
- PESSOA, G. V. A.; SILVA, E. A. M. Meios Rugai e Lisina-motilidade combinados em um só tubo para a identificação presumtiva de enterobactérias. *Rev. Inst. Adolfo Lutz.*, v. 32, p. 97-100, 1972.

PHILLIPS M.; KAILASAPATHY K.; TRAN L. Viability of commercial probiotic cultures (*L. acidophilus*, *Bifidobacterium* sp., *L. casei*, *L. paracasei* and *L. rhamnosus*) in cheddar cheese. *Int. J. Food Microbiol.* v.108, n.2, p.276-280, 2006.

PICININ, L. C. A., CERQUEIRA, M. M. O. P., SOUZA, M. R. *et al* . Diagnóstico de situação da qualidade da água de fazendas leiteiras de Minas Gerais. *Rev. Inst. Latic. Cândido Tostes.*, v.56, n.321, p.301- 310, 2001.

PILONETTO, M.; PILONETTO, D. V.; Manual de procedimentos laboratoriais em microbiologia: POPs em microbiologia, Curitiba: Microscience, 1998.

PINTO, M. S. *Diagnóstico socioeconômico, cultural e avaliação dos parâmetros físico-químicos e microbiológico do queijo minas artesanal do Serro*. 2004. 151 f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) _ Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG.

PINTO, V. N. O ouro brasileiro e o comércio anglo-português. São Paulo: Companhia Editora Nacional, 1979. 346 p.

PINTO, M. S.; FERREIRA, C. L. L. F.; MARTINS, J. M. *et al* . Segurança alimentar do queijo Minas artesanal do Serro, Minas Gerais, em função da adoção de boas práticas de fabricação. *Pesq. Agropec. Trop.* v. 39, n. 4, p. 342-347, 2009.

PISANO, M. B.; CASULA, M.; CORDA, A. *et al* . In vitro probiotic characteristics of *Lactobacillus* strains isolated from Fiore Sardo cheese. *Ital. J. Food Sci.*, v. 20, n. 4, p. 505-516, 2008.

POFFO, F.; SILVA, M. A. C. Caracterização taxonômica e fisiológica de bactérias ácido-láticas isoladas de pescado marinho. *Ciênc. Tecnol. Aliment.*, v. 31, n. 2, p. 303-307, 2011.

POPESCU, G. A.; BENEÁ, E.; MITACHE, E. *et al* . An unusual bacterium, *Aerococcus viridans*, and four cases of infective endocarditis. *J. Heart Valve Dis.*, v.14, n.3, p.317–319, 2005.

PRADO, G.; OLIVEIRA, M. S.; PEREIRA, M. L. *et al* . Aflatoxin M1 in samples of "minas" cheese commercialized in the city of Belo Horizonte - Minas Gerais/Brazil. *Ciênc. Tecnol. Aliment.*, v.20, n.3, p.398-400,2000.

PSONI, L.; KOTZAMANIDES, C.; ANDRIGHETTO, C. *et al* . Genotypic and phenotypic heterogeneity in *Enterococcus* isolates from Batzos, a raw goat milk cheese. *Int. J. Food Microbiol.*, v.109, n.1-2, p.109-120, 2006.

QUIGLEY, L.; O'SULLIVAN, O.; BERESFORD, T.P. *et al* .High throughput sequencing for detection of subpopulations of bacteria not previously associated with artisanal cheeses. *Appl Environ Microbiol.* v.78, n.16, p.5717–5723, 2012.

RAMIREZ-CHAVARIN, M. L.; WACHER, C.; ESLAVA-CAMPOS, C.A. *et al* . Probiotic potential of thermotolerant lactic acid bacteria strains isolated from cooked meat products. *Int. Food Res. J.* v.20, n.2, p.991-1000, 2013.

RANDAZZO, C. L.; CAGGIA, C.; NEVIANI, E. Application of molecular approaches to study lactic acid bacteria in artisanal cheeses. *J. Microbiol. Meth.*, v. 78, n. 1, p. 1-9, 2009.

- RANDAZZO, C. L.; VAUGHAN, E. E.; CAGGIA, C. Artisanal and experimental Pecorino Siciliano cheese: microbial dynamics during manufacture assessed by culturing and PCR–DGGE analyses. *Int. J. Food Microbiol.* v.109, n.1-2, p.1-8. 2006.
- RENYE JR., J. A.; SOMKUTI, G. A.; VAN HEKKEN, D. L. *et al* . Short communication: Characterization of microflora in Mexican Chihuahua cheese. *Dairy Sci.* v.94, n.7, p.3311–3315, 2011.
- RESENDE, M. F. S. *Queijo Minas artesanal da Serra da Canastra: influência da altitude e do nível de cadastramento das queijarias nas características físico-químicas e microbiológicas.* 2010. 72 f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia e Inspeção de produtos de Origem Animal)- Escola de Veterinária, Universidade de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG.
- RESENDE, M. F. S.; COSTA, H. H. S.; ANDRADE, E. H. P. *et al* . Queijo-de-minas artesanal da Serra da Canastra: influência da altitude das queijarias nas populações de bactérias ácido-lácticas. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v.63, n.6, p.1532-1538, 2011.
- REZENDE, P. H. L.; MENDONÇA, E.P.; MELO, R.T. *et al* . Aspectos sanitarios do queijo Minas artesanal comercializado em feiras-livres. *Rev. Inst. Latic. Cândido Tostes.* v.65, n.377, p.36-42, 2010.
- RIBEIRO, J.A. Queijos do Brasil. *Rev. Inst. Latic. Cândido Tostes.*, v. 14, n. 86, p. 33-34, 1959.
- RICARDO, N. R.; KATSUDA, M. S.; MAIA, L.F. *et al* . Análise físico-química de queijos Minas frescal artesanais e industrializados comercializados em Londrina-PR. *Revista Brasileira de Pesquisa em Alimentos.* v.2, n.2, p. 89-95, 2011.
- RILEY, M. A.; WERTZ, J. E. Bacteriocins: evolution, ecology, and application. *Annu. Rev. Microbiol.*, v. 56, p. 117-137, 2002.
- RODRIGUES, P. M. *Microbiologia dos Processos Alimentares.* São Paulo: Varela, 2005.
- RODRIGUEZ-AMAYA, D. B.; SABINO, M. Pesquisa em micotoxinas no Brasil: a última década em foco. *Braz. J. Microbiol.*, v. 33, n. 1, p.1-11, 2002.
- RÖNKÄ, E.; MALINEN, E.; SAARELA, M. *et al* . Probiotic and milk technological properties of *Lactobacillus brevis*. *Int J. Food Microbiol.* v.83, n.1, p.63-74, 2003.
- REYSENBACH, A. L.; LONGNECKER, K.; KIRSHTEN, J. Novel bacterial and archaeal lineages from an *in situ* growth chamber deployed at a mid-atlantic ridge hydrothermal vent. *Appl. Environ. Microbiol.* v. 66, n. 9, p. 3798-3806, 2000.
- SAINT-HILAIRE, A. *Viagem às nascentes do rio São Francisco.* Belo Horizonte: Editora Itatiaia, 1975. 190 p.
- SAINT-HILAIRE, A. *Viagem pelo distrito dos diamantes e litoral do Brasil.* Belo Horizonte: Editora Itatiaia, 1974. 233 p.
- SALOTTI, B. M.; CARVALHO, A. C. F. B.; AMARAL, L. A. *et al* . Qualidade microbiológica do queijo Minas frescal comercializado no município de Jaboticabal, SP, Brasil. *Arq.Inst. Biol.*,v. 73, n. 2, p.171-175, 2006.

- SANTOS, A. S. *Queijo Minas artesanal da microrregião do Serro-MG: efeito da sazonalidade sobre a microbiota do leite cru e comportamento microbiológico durante a maturação*. 2010. 68 f. Dissertação (Dissertação apresentada ao Curso de Pós- Graduação Stricto Sensu em Produção Animal). Faculdade de Ciências Agrárias da Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri, Diamantina.
- SANTOS, M. V. Qualidade da água e qualidade do leite. *Revista Mundo do Leite*, São Paulo, n. 47, p. 20-21. 2011
- SANTOS, M. V.; FONSECA, L. F. L. *Estratégias para controle da mastite e melhoria da qualidade do leite*. Barueri, SP: Manole; Pirassununga, SP: Editora dos Autores, 2007. 314p.
- SARANTINOPOULOS, P.; KALATOPOULOS, G.; TASKALIDOU, E. Effect of *Enterococcus faecium* on microbiological, physicochemical and sensory characteristics of greek feta cheese. *Int. J. Food Microbiol.*, v.76, n. 1, p. 93-105, 2002.
- SCHACHTSIEK, M.; HAMMES, W. P.; HERTEL, C. Characterization of *Lactobacillus coryniformis* DSM 20001T surface protein Cpf mediating coaggregation with and aggregation among pathogens. *Appl. Environ. Microb.*, v.70, n.12, p.7078-85, 2004.
- SHELLENBERG, J.; SMORAGIEWICZ, W.; KARSKA-WYSOCKI, B. A rapid method combining immunofluorescence and cytometry for improved understanding of competitive interactions between lactic acid bacteria (LAB) and methicillin-resistant *S. aureus* (MRSA) in mixed culture. *J. Microbiol. Meth.*, v.65, n.1, p.1-9, 2006.
- SCHUENCK, R. P.; PEREIRA, E. M.; IORIO, N. L. *et al* . Multiplex PCR assay to identify methicillin- resistant *Staphylococcus haemolyticus*. *FEMS IMMUNOL. MED. MIC.*,v.52, n.3, p.431-435, 2008.
- SCHWAB, C. G. Amino acid nutrition of the dairy cow: current status. In: CORNELL NUTRITION CONFERENCE FOR FEED MANUFACTURERS, 1996, Ithaca, NY. *Proceedings....* Ithaca, NY: Cornell University, 1996. p.184-198.
- SCOTT, R. *Fabricación de queso*. 2 ed., Zaragoza, Espanha, 2002.
- SEBRAE- Serviço Brasileiro de Apoio às Micro e Pequenas Empresas. Queijos Nacionais: estudos de mercado. SEBRAE/ESPM. SEBRAE, 2008. 34p
- SENGER, A. E. V.; BIZANI, D. Pesquisa de *Staphylococcus aureus* em queijo Minas frescal, produzido de forma artesanal e industrial, comercializado na cidade de Canoas/RS, Brasil. *Revista de Ciências Ambientais*, v. 5, n. 2, p. 25 a 42, 2011.
- SERIDAN, B.; SOUZA, M. R.; NICOLI, J. R. *et al* . Viabilidade de *Staphylococcus aureus* FRI S-6 e produção de SEB em queijo elaborado com adição de *Lactobacillus rhamnosus* e *Lactococcus lactis*. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v.64, n.2, p.465-470, 2012.
- SHAPIRO, S. S.; WILK, M. B. An analysis of variance test for normality (complete samples). *Biometrika*, v. 52, n.3-4, p. 591-611, 1965.

SILVA, F.; SILVA, G. *Análise microbiológica e físico-química de queijos coloniais com e sem inspeção, comercializados na microrregião de Francisco Beltrão-PR.* 2013. 59f. Trabalho (conclusão de curso)_ Curso Superior de Tecnologia de Alimentos. Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Francisco Beltrão, PR.

SILVA, J. G. *Características físicas, físicoquímicas e sensoriais do queijo Minas artesanal da Canastra.* 2007. 198f. Dissertação (Mestrado em Ciência dos Alimentos) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

SILVA, J. G.; ABREU, L. R.; MAGALHÃES, F. A. R. *et al* . Características físico-químicas do queijo Minas artesanal da Canastra. *Rev. Inst. Latic. Cândido Tostes.*, v.380, n. 66, p. 16-22, 2011.

SILVA, M. C. D.; RAMOS, A.C.S.; MORENO, I. *et al* . Influencia dos procedimentos de fabricacao nas características físico-químicas, sensoriais e microbiológicas de queijo de coalho. *Rev Inst Adolfo Lutz.* Sao Paulo, v.69, n.2, p.214-21, 2010.

SILVA, N.; JUNQUEIRA, V. C. A.; SILVEIRA, N. F. A. *et al* . *Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos.* 3. ed.. São Paulo: Livraria Varela, 2007.

SMIT, G.; SMIT, B. A.; ENGELS, W. J. M.. Flavour formation by lactic acid bacteria and biochemical flavour profiling of cheese products. *FEMS Microbiol. Rev.*, v. 29, n.3, p.591–610, 2005.

SOUSA, D. D. P.; GUIMARÃES, R.; VILLELA, F. R. M. A. *et al* . Avaliação da qualidade higiênico-sanitária de queijo Minas frescal e meia crua comercializados de forma informal em Jacareí-SP. *Revisa.*, v.2, n.1, p. 60-63, 2006.

SOUSA, J. G.; COSTA, F. N.; ALVES, L. M. C. *et al* . Pesquisa de estafilococos coagulase positiva em manipuladores de uma unidade de alimentação, na cidade de São Luís, MA. *Hig. Aliment.* São Paulo. v.21, n.152, p.69-75, 2007.

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.

SPREER, E. *Lactologia industrial.* 2 ed. Zagarosa: Ed. Acribia, 1991. 617p.

STAMFORD, T.L.M.; SILVA, C.G.M.; MOTA, R.A. *et al* . Enterotoxigenidade de *Staphylococcus* spp. isolados de leite in natura. *Rev. Ciên. Tecnol. Aliment.* v.26, n.1, 2006.

STILES, M. E. 1994. Bacteriocins produced by *Leuconostoc* species. *J. Dairy Sci.*, v. 77, n.9, p.2718–2724.

STINGHEN, A. E. M.; ALBINI, C. A.; SOUZA, H. A. P. H. *Coloração de Gram, como fazer, interpretar e padronizar.* Curitiba: Microscience 2002.

SUHREN, G.; WALTE, H. G. First experiences with automatic flow cytometric determination of total bacteria count in raw milk. *Bulletin of the International Dairy Federation*, n. 358, p. 36-48, 2000.

ŠVEC, P.; SEDLÁČEK, I. Characterization of *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* isolated from surface waters. *Folia Microbiol.* v.53,n.1, p.53–56, 2008.

TEBALDI, V. M. R.; OLIVEIRA, T. L. C.; BOARI, C. A. *et al* . Isolamento de coliformes, estafilococos e enterococos de leite cru provenientes de tanques de refrigeração por expansão comunitários: identificação, ação lipolítica e proteolítica. *Ciênc. Tecnol. Aliment.*, v. 28, n. 3, p. 753- 760, 2008.

TEIXEIRA, L. M.; MERQUIOR, V.L.C.; VIANNI, M.C.V. *et al* . Phenotypic and genotypic characterization of atypical *Lactococcus garvieae* strains isolated from water buffalos with subclinical mastitis and confirmation of *L. garvieae* as a senior subjective synonym of *Enterococcus seriolicida*. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, v.46, n.3, p.664–668, 1996.

TEIXEIRA, L. V.; FONSECA, L. M.; MENEZES, L. D. M. Avaliação da qualidade microbiológica do soro de queijos Minas padrão e mozzarella produzidos em quatro regiões do estado de Minas Gerais. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v.59, n.1, p.264-267, 2007.

TEMPERATURAS diárias (máxima, média, mínima)- Estação Barbacena (MG) 12/2013. 2013. Disponível em < <http://www.inmet.gov.br/portal/index.php?r=tempo/graficos>>. Acessado em 10 dez. 2014.

TEMPERATURAS diárias (máxima, média, mínima)- Estação Barbacena (MG) 04/2014. 2014a. Disponível em < <http://www.inmet.gov.br/portal/index.php?r=tempo/graficos>>. Acessado em 10 dez. 2014.

TEMPERATURAS diárias (máxima, média, mínima)- Estação Barbacena (MG) 07/2014. 2014b. Disponível em < <http://www.inmet.gov.br/portal/index.php?r=tempo/graficos>>. Acessado em 10 dez. 2014.

TERZIC-VIDOJEVIC, A.; TOLINACKI, M.; NIKOLIC, M. *et al* . Phenotypic and genotypic characterization of lactic acid bacteria isolated from Azerbaijani traditional dairy products. *Afri. J. Biotechnol.*, v. 8, n.11, p. 2576-2588, 2009.

TOMAZI, T. *Produção e composição do leite de vacas com mastite subclínica causada por Staphylococcus coagulase negativa*. 2013. 113 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, Pirassununga, SP.

TORRIANI, S.; FELIS, G. E.; DELLAGLIO, F. Differentiation of *Lactobacillus plantarum*, *L. pentosus*, and *L. paraplantarum* by *recA* gene sequence analysis and multiplex PCR assay with *recA* gene-derived primers. *Appl. Environ. Microb.*, v. 67, n. 8, p. 3450-3454, 2001.

TRABULSI, L. R.; ALTERTHUM, F. *Microbiologia*. 4. ed. São Paulo: Ed. Atheneu, 2005. 718p.

TROVATELLI, L. D., SCHIESSER, A., MASSA, S. Identification and significance of enterococci in hard cheese made from raw cow and sheep milk. *Milchwissenschaft.*, v.42, p.717–719, 1987.

TURCHI, B.; VAN TASSEL, M. L.; LEE, A. *et al* . Phenotyp and genetic diversity of wild *Lactococcus lactis* isolates from tradicional Pecorino cheeses of Tuscany. *J. Dairy Sci.*, v.96, n.6, p. 3558-3563, 2013.

- VALADARES FILHO, S. C.; VALADARES, R. F. D. Recentes avanços em proteína na nutrição de vacas leiteiras. In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL DE BOVINOCULTURA DE LEITE, SINLEITE, 2., 2001, Lavras. *Anais...* Lavras: Universidade Federal de Lavras, 2001, p.228-243.
- VANZO, S. P.; AZEVEDO, R. V. P. Detecção de *Staphylococcus aureus* em manipuladores de alimentos – perfil de resistência a antibióticos e quimioterápicos. *Hig. aliment.*, v.17, n.104/105, p. 114-122, 2003.
- VARGAS, O. L.; PORTO, M. A. C.; BRITO, A. L. Características de origens para queijos naturais de Minas Gerais: Municípios do Serro e de São Roque de Minas. *Rev. Inst. Latic. Cândido Tostes.*, v.53,n. 301-301 p.19-49, 1998.
- VASCONCELOS, M. A. S.; MELO FILHO, A. B.; *Conservação de alimentos*. Recife: EDUFRE, 2010. 130p.
- VASEK, O. M.; MAZZA, S. M.; GIORI, G. S. Physicochemical and microbiological evaluation of corrientes artisanal cheese during ripening. *Food Sci. Technol.*, v.33, n.1, p.151-160, 2013.
- VELJOVIC, K.; TERZIC-VIDOJEVIC, A., VUKASINOVIC, M. *et al* . Preliminary characterization of lactic acid bacteria isolated from Zlatar cheese. *J Appl Microbiol.*, v. 103, n. 6, p. 2142-2152, 2007.
- VERAS, F. V . *Identificação por PCR de genes para produção de SEA, SEB, SEC e SED em linhagens de Staphylococcus sp . isolados de surtos de toxinfecção alimentar por leite e derivados* . 2004. 82f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Escola de Medicina Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG.
- VERDIER-METZ, I.; MICHEL, V.; DELBE`S, C. *et al* . Do milking practices influence the bacterial diversity of raw milk? *Food Microbiol.*, v.26, n.3, p.305–310, 2009.
- VOLKMAN, H; IMINIANOVSKY, U.; CAVALHERI, N. *et al* . Avaliação microbiológica de diferentes tipos de queijos produzidos em Rodeio, SC. In: CONGRESSO NACIONAL DE LATICÍNIOS, 19., 2002, Juiz de Fora. *Anais...*Juiz de Fora: Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes, 2002. p.165-166.
- VON EIFF, C.; PROCTOR, R. A.; PETERS, G. Coagulase-negative staphylococci. pathogens have major role in nosocomial infections. *POSTGRAD. MED.*v.110, n.4, p.73-76, out. 2001.
- VON SPERLING, M. *Princípios do tratamento biológico de águas residuárias: Introdução à qualidade das águas e ao tratamento de esgotos*. 3. ed. Belo Horizonte/MG: Editora Universitária, 2005, v1.
- WARD, L.J.H., TIMMINS, M.J. Differentiation of *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus paracasei* and *Lactobacillus rhamnosus* by polymerase chain reaction. *Lett. Appl. Microbiol.*, v.29, n.2, p.90–92, 1999.
- WATTIAUX, M. A. Composição do leite e seu valor nutricional. Essenciais em Gado de Leite, n.19, p.73-76, 2012. Instituto Babcock para Pesquisa e Desenvolvimento da Pecuária Leiteira Internacional, University of Wisconsin-Madison. Disponível em: <http://babcock.wisc.edu/sites/default/files/de/pt/de_19.pt.pdf> Acessado em: 05 dez. 2014.

WELTHAGEN, J. J.; VILJOEN, B. C. The isolation and identification of yeasts obtained during the manufacture and ripening of Cheddar cheese. *Food Microbiol.* v.16, n.1, p.63–73, 1999.

WHO. World Health Organization. Guidelines for Drinking - water quality – 4 ed. 2011. Disponível em: <http://www.who.int/water_sanitation_health/publications/2011/dwq_chapters/en/index.html> Acessado em: 02 dez. 2014.

WINCK, C. A. ; SCARTON, L. M. ; SAGGIN, K. D. *et al* . Padrões de qualidade do leite cru no Brasil: inserção mercadológica internacional ou exclusão social. In: CONGRESSO LATINOAMERICANO DE SOCIOLOGIA RURAL, 8., 2010, Porto de Galinhas/PE. *Anales...* Porto de Galinhas: Associacion LatinoAmericana de Sociologia Rural-ALASRU 2010. v. I. p. 1-15.

WITWER, F. Diagnóstico dos desequilíbrios metabólicos de energia. In: GONZALEZ, F.H.D.; BARCELLOS, J.O.; OSPINA, H. *et al* . (Eds.) *Perfil metabólico em ruminantes: seu uso em nutrição e doenças nutricionais*. Porto Alegre: Universidade Federal do Rio Grande do Sul. 2000. p.9-22.

WOLFSCHOON-POMBO, A. F. Índices de proteólise em alguns queijos brasileiros. *Boletim do Leite*, v. 51, n. 661, p. 1-8, 1983.

YANAGIDA, F.; CHEN, Y-S.; SRIONNUAL, S. *et al* . Bacteriocin from *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* C101910 isolated from lake water. *Jpn. J. Lactic Acid Bact.*, v.17, p.51–56, 2006.

ZAFALON, L. F; ARCARO, J. R.P; NADER FILHO, A. *et al* . Utilização do teste de voges-proskauer e da coagulase para o diagnóstico laboratorial de *staphylococcus aureus* envolvidos na epidemiologia da mastite bovina. *Ciênc. Anim. Bras.*, v.10, n. 4, p. 1285-1293, 2009.

ZAHEDI, F.; HEYDARI NASRABADI, M.; TAJABADI EBRAHIMI, M. *et al* . Study the effect of *Lactobacillus brevis* isolated from Iranian traditional cheese on cutaneous wound healing in male rats on days 3 and 14. *RJMS*, v.18, n.88, p.16-23, 2011.

ZHANG, H.; CAI, Y. *Lactic acid bacteria: Fundamentals and Practice*. Springer Science, 2014. 535p.

ZOTTOLA, E. A; SMITH, L. B. Pathogens in cheese. *J. Food Microbiol.*, v. 8, n.3, p.171-182, 1991.

9. ANEXOS

Anexo 1. Questionário para elaboração do perfil higiênico-sanitário das propriedades e queijarias dos produtores não cadastrados pelo IMA em Campo das Vertentes – MG

PESQUISA: QUALIDADE MICROBIOLÓGICA E FÍSICO-QUÍMICA DE QUEIJOS ARTESANAIS DA REGIÃO DE CAMPOS DAS VERTENTES – MG

RELATÓRIO TÉCNICO DE VISITA A PROPRIEDADE

Data: _____ Professor: _____ Relatores: _____
Propriedade: _____
Localidade: _____ Proprietário: _____
Reside na propriedade () sim () não
Distância do município: _____
Endereço para correspondência: _____
CEP: _____ Entrevistado: _____ Veterinário responsável – técnico de assistência rural:
End.: _____ CEP: _____ Fone: _____

1. DADOS DA FAZENDA

Principal atividade: _____
Sistema de criação: _____
Assistência Veterinária: _____
Escrituração Zootécnica / Programa de Controle do Rebanho: _____
Área: _____ Área destinada à produção de leite: _____
Alimentação dos animais: _____
Divisão de pastos e/ou piquetes: _____ Origem da água: _____

2. DADOS DO REBANHO LEITEIRO

Número total de animais: _____ Composição genética: _____
Formação do rebanho: _____
Entrada de animais: _____
Vacas em lactação: _____ Vacas secas: _____
Novilhas: _____ Bezerras: _____ Touros: _____

3. PRODUÇÃO DE LEITE

Volume de leite diário e média: _____ Custo de produção: _____
Preço recebido: _____
Controle leiteiro: _____ Uso de BST: _____
Período lactação/seco: _____ Tipo de secagem: _____

4. ORDENHA

Tipo: _____ Local: _____ Horários: _____
Relação ordenhador/vaca: _____ Duração da ordenha: _____
Rotina pré-ordenha: _____
Rotina de pós ordenha: _____

Limpeza dos utensílios e equipamentos: _____
Pulsção: _____
Pressão de vácuo: _____ Sobre-ordenha: _____
Alimentação: _____
Análise da água: _____
Estocagem do leite (local e temperatura): _____
Limpeza do tanque de expansão: _____

5. CONTROLE DE MASTITE

Caneca telada: _____ CMT/CCS: _____
Tratamento: _____
Destino do leite durante o tratamento: _____
Período de retenção do leite: _____

6. PRODUÇÃO DO QUEIJO ARTESANAL

Horários e dias de produção: _____
Local / descrição da queijaria: _____
Água: _____
Encarregado da produção/qualificação: _____
Utensílios utilizados e sanificação: _____
Ingredientes/quantidades/seleção: _____
Descrição dos procedimentos: _____
Maturação: _____
Comercialização: _____

Anexo 2. Produtos da amplificação do 16S rDNA por PCR de algumas das amostras de bactérias ácido-láticas

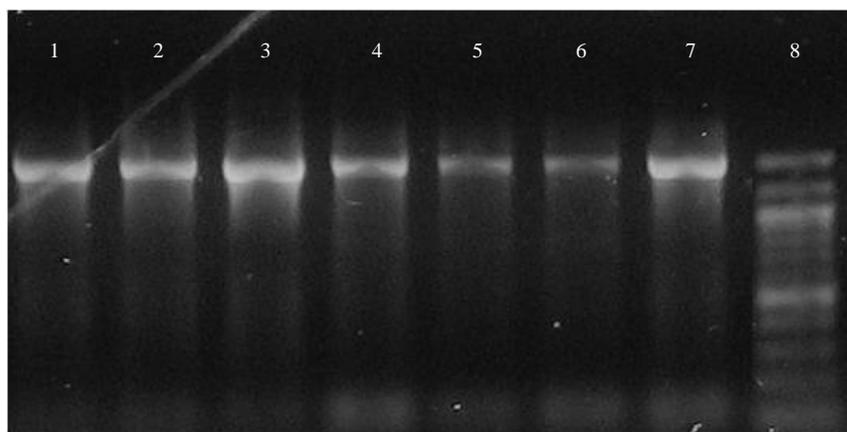


Figura 9- Produtos da amplificação do 16S rDNA por PCR de algumas das amostras de bactérias ácido-láticas (canaletas da esquerda para a direita: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7- *Amplicons* do 16S rDNA; 8- marcador de peso molecular).

Anexo 3. Produtos da amplificação da região do gene *recA* a partir da técnica de PCR *multiplex* das amostras identificadas como *Lactobacillus plantarum*

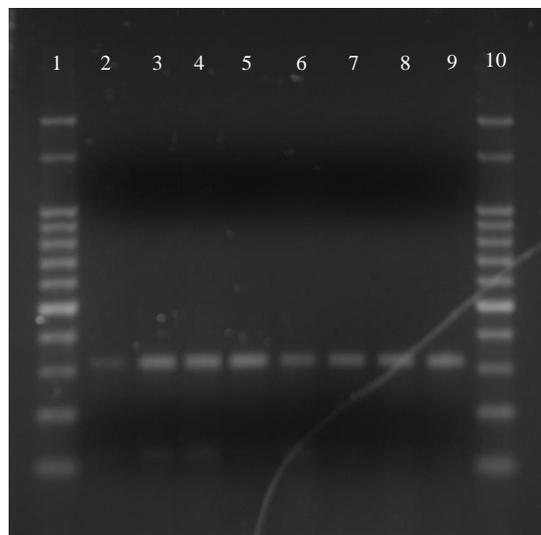


Figura 10- Produtos da amplificação da região do gene *recA* a partir da técnica de PCR *multiplex* das amostras identificadas como *Lactobacillus plantarum* (canaletas da esquerda para a direita: 1- marcador de peso molecular; 2,3,4,5,6,7, 8, 9- *Lactobacillus plantarum*; 10 – marcador de peso molecular).

Anexo 4. Produtos da amplificação da região V1 a partir da técnica de PCR das amostras identificadas como *Lactobacillus paracasei* e *Lactobacillus rhamnosus*

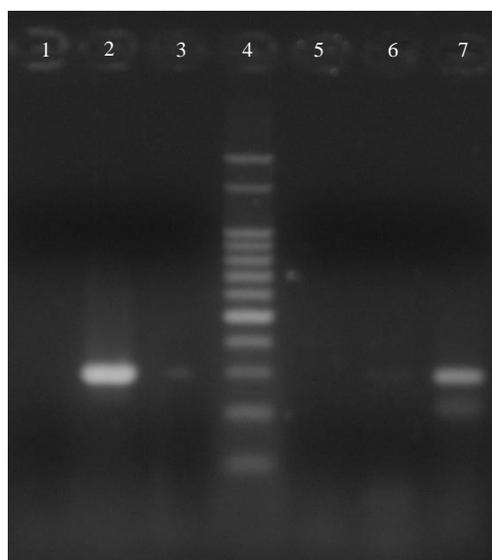


Figura 11- Produtos da amplificação da região V1a partir da técnica de PCR das amostras identificadas como *Lactobacillus paracasei* e *Lactobacillus rhamnosus* (canaletas da esquerda para a direita: 1, 2 e 3- *Lactobacillus paracasei*, sendo as combinações de *primers* iguais a 1- *Y2/casei*; 2- *Y2/para* e 3- *Y2/rham*; 4- marcador de peso molecular; 5, 6 e 7 – *Lactobacillus rhamnosus*, sendo as combinações de *primers* 5- *Y2/casei*; 6- *Y2/para* e 7- *Y2/rham*).