

**EDITE ANDRADE COSTA**

**CARACTERÍSTICAS MICROBIOLÓGICAS E ESTUDO DA BIODIVERSIDADE DO  
QUEIJO MINAS ARTESANAL DA REGIÃO DAS ENTRE SERRAS: DA PIEDADE  
AO CARAÇA**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

Orientador: Antônio Fernandes de Carvalho

Coorientadoras: Rosângela de Freitas  
Solimar Gonçalves Machado

**VIÇOSA - MINAS GERAIS  
2021**

**Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Central da Universidade  
Federal de Viçosa - Campus Viçosa**

T

C837c  
2021  
Costa, Edite Andrade, 1994-  
Características microbiológicas e estudo da biodiversidade  
do queijo Minas artesanal da região das Entre Serras: da piedade  
ao caraça / Edite Andrade Costa. – Viçosa, MG, 2021.  
100 f.: il. (algumas color.).

Inclui apêndice.

Orientador: Antônio Fernandes de Carvalho.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa,  
Departamento de Tecnologia de Alimentos, 2021.

Referências bibliográficas: f. 83-97.

DOI: <https://doi.org/10.47328/ufvbbt.2022.026>

1. Queijo-de-minas - Microbiologia. 2. Queijo-de-minas -  
Variedades. 3. Queijo-de-minas - Diversidade genética.  
I. Carvalho, Antônio Fernandes de, 1964-. II. Universidade  
Federal de Viçosa. Departamento de Tecnologia de Alimentos.  
Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de  
Alimentos. III. Título.

CDD 22. ed. 637.353

Bibliotecário(a) responsável: Bruna Silva CRB6/2552

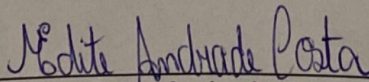
**EDITE ANDRADE COSTA**

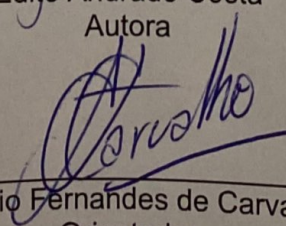
**CARACTERÍSTICAS MICROBIOLÓGICAS E ESTUDO DA BIODIVERSIDADE DO  
QUEIJO MINAS ARTESANAL DA REGIÃO DAS ENTRE SERRAS: DA PIEDADE  
AO CARAÇA**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

APROVADA: 22 de outubro de 2021

Assentimento:

  
\_\_\_\_\_  
Edite Andrade Costa  
Autora

  
\_\_\_\_\_  
Antonio Fernandes de Carvalho  
Orientador

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus, a quem dedico minha vida, por estar sempre presente nos bons momentos e nos mais difíceis, fazendo com que tenha força, disposição e saúde para seguir em frente;

Ao Professor Antonio Fernandes de Carvalho pela orientação, profissionalismo, incentivo, apoio e compreensão durante o curso;

A Universidade Federal de Viçosa (UFV) pela oportunidade de realização do curso de doutorado;

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de estudo;

A Embaixada da Nova Zelândia pelo financiamento de grande parte do projeto.

Aos professores integrantes da banca examinadora Rosangela de Freitas, Solimar Gonçalves Machado, Anderson Carlos Camargo e Maurilio Lopes Martins por aceitarem contribuir com esse trabalho.

Ao meu Lucca que trouxe luz para minha vida e mais força para tornar meus sonhos possíveis.

A meu pai Miltinho, minha mãe Terezinha, pela minha criação, educação, por me apoiar em cada decisão tomada e amor em todos os momentos da vida;

À minha irmã Laura, pela amizade, carinho e amor constante;

Ao Jhony, pelo carinho, amizade, paciência e pelo amor que foi indispensável a cada instante e que me ajudou a enfrentar as dificuldades e obstáculos encontrados no caminho, que foi um parceiro de todos os instantes no Doutorado, dividindo comigo as viagens às regiões produtoras de queijos minas artesanais.

À minha família (Celinha, Natalia, Jucélia, Ninim, Vicente, Benício), pela amizade, carinho e incentivo;

Aos meus familiares e amigos de Tocantins, pela amizade, carinho e apoio;

A todos os produtores de queijos minas artesanais da região das Entre Serras, pela abertura concedida ao projeto, pelos relatos de experiências e pela hospitalidade.

À Empresa de Assistência Técnica e Extensão Rural (EMATER), especialmente ao seu Coordenador de Assistência Técnica Edson, pelas

informações e experiências vivenciadas durante o projeto.

Agradeço a todos os Professores do Departamento de Tecnologia de Alimentos que contribuíram, de uma forma ou de outra, para o meu aprendizado, seja em sala de aula, com seus trabalhos publicados ou com suas palestras apresentadas;

A Thaiza e os estagiários que estiveram comigo no início dos experimentos que não mediram esforços durante as realizações de todas as análises, mostrando-se sempre atentos e dispostos a colaborar.

A todos os amigos e companheiros da Pós-graduação do Inovaleite, principalmente àqueles que dividiram comigo os laboratórios de análises. Em especial ao Jean que esteve comigo desde a graduação.

A todos os amigos, companheiros de curso e laboratório, que mesmo não sendo citados aqui, tanto contribuíram para a conclusão desta etapa.

## RESUMO

COSTA, Edite Andrade, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, outubro de 2021. **Características microbiológicas e estudo da biodiversidade do queijo Minas artesanal da região das Entre Serras: da piedade ao caraça.** Orientador: Antônio Fernandes de Carvalho. Coorientadoras: Rosângela de Freitas e Solimar Gonçalves Machado.

Os queijos artesanais de leite cru apresentam texturas, sabores e aromas únicos, resultado da ligação que possuem com os diferentes territórios, climas, pastos, modos e tradições do fazer artesanal de cada região. O queijo Minas artesanal (QMA) da Entre Serras é produzido por pequenos produtores, na região entre a Serra da Piedade ao Caraça, por ser fabricado com leite cru, é importante que os patógenos que podem ser veiculados sejam controlados durante e após o período mínimo de maturação do queijo. Os principais objetivos desse trabalho foram caracterizar a qualidade e a inocuidade microbiológica deste produto e investigar os pontos-chave da contaminação em sua cadeia de produção, e avaliar o perfil microbiológico durante a maturação dos queijos produzidos por quatro produtores rurais da região. As contagens de mesófilos aeróbios, coliformes totais, *Escherichia coli*, e *Staphylococcus aureus* foram realizadas em placas Petrifilm® (3M). A detecção de *Salmonella* sp. e *Listeria monocytogenes* foi realizada utilizando o método convencional, já a biodiversidade bacteriana do QMA foi caracterizada através da extração direta de DNA e sequenciamento de alto desempenho. A média das contagens de mesófilos aeróbios estritos e facultativos viáveis no QMA da Entre Serras foi de 7,79 log UFC/g, para coliformes foi de 4,74 log UFC/g. Sendo que 64,28% das amostras apresentaram contagens de coliformes superiores aos valores de referência. *E. coli* foi identificada em 57,14% das amostras de QMA com uma média de contagem de 4,31 log UFC/g, e *S. aureus* foi detectado em 71,43% das amostras QMA. Para as queijarias 'controle', os tempos mínimos para adequação aos parâmetros microbiológicos foram de 30 dias, as queijarias 'contaminadas' precisaram de um tempo mínimo de maturação 60 dias. Todas as amostras de QMA analisadas apresentaram ausência de *L. monocytogenes* e *Salmonella* sp. O perfil microbiológico dos queijos artesanais foi monitorado durante os 60 dias de maturação, *Lactococcus* foi identificado como o gênero dominante. *Enterococcus*, *Streptococcus*, *Lactobacillus* e *Leuconostoc* também foram prevalentes. No entanto,

*Staphylococcus*, coliformes e enterobactérias como *Klebsiella*, *Serratia* e *Citrobacter* foram identificados em alta proporção. A abundância relativa de gêneros e espécies bacterianas, bem como as mudanças ao longo do processo de maturação do QMA variaram de queijaria para queijaria. As informações obtidas permitiram a identificação de pontos-chave de contaminação microbiológica no processamento de QMA, mostrando que programas de controle de qualidade e segurança devem ser adotados por esses produtores. O período de maturação tem influência sobre as características microbiológicas, já que durante este período houve redução nas contagens de coliformes totais, mesófilos aeróbios, *E. coli* e *S. aureus*. Através desta pesquisa foram obtidas informações iniciais sobre a diversidade bacteriana do QMA Entre Serras. Novos estudos ainda são necessários para viabilizar o desenvolvimento do setor produtivo, para valorizar a produção tradicional nessa região e estimular o melhoramento da qualidade dos queijos, para garantir a sua comercialização em todo o Brasil.

Palavras-chave: Maturação. Sequenciamento de alto desempenho. Queijo Artesanal.

## ABSTRACT

COSTA, Edite Andrade, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, October, 2021. **Microbiological characteristics and study of the biodiversity of artisanal Minas cheese from the Serras region: from piety to caraça.** Adviser: Antônio Fernandes de Carvalho. Co-advisers: Rosângela de Freitas and Solimar Gonçalves Machado.

The artisanal raw milk cheeses have unique textures, flavors and aromas, as result of the connection they have with the different territories, climates, pastures, ways and traditions of artisanal production in each region. The Entre Serras Minas artisanal cheese (MAC) is manufactured by small producers in the region between Serra da Piedade and Caraça. Serra da Piedade and Caraça, because it is made with raw milk, it is important that the pathogens that can be transmitted are controlled during and after the minimum period for the cheese to mature. The main objectives of this work was characterize the microbiological quality and safety of this product, to investigate the key points of contamination in its production chain, and to evaluate the microbiological profile during the ripening of cheeses produced by four rural producers in the region. Counts of aerobic mesophiles, total coliforms, *Escherichia coli*, and *Staphylococcus aureus* were performed using Petrifilm® (3M) plates. Detection of *Salmonella* sp. and *Listeria monocytogenes* was performed using the conventional method, while the bacterial biodiversity of the MAC was characterized through direct DNA extraction and high-performance sequencing. The mean counts of strict and facultative aerobic mesophiles counts in the Entre Serras MAC was 7.79 log CFU/g, for coliforms it was 4.74 log CFU/g. 64.28% of the samples had coliform counts above the reference values. *E. coli* was identified in 57.14% of the MAC samples with a mean count of 4.31 log CFU/g, and *S. aureus* was detected in 71.43% of the MAC samples. For the 'control' dairies, the minimum times to adapt to the microbiological parameters were 30 days, the 'contaminated' dairies needed a minimum period of aging of 60 days. All MAC samples analyzed showed absence of *L. monocytogenes* and *Salmonella* sp. The microbiological profile of artisanal cheeses was monitored during the 60 days of ripening, *Lactococcus* was identified as the dominant genus. *Enterococcus*, *Streptococcus*, *Lactobacillus* and *Leuconostoc* were also prevalent. However, *Staphylococcus*, coliforms and enterobacteria such as *Klebsiella*, *Serratia* and *Citrobacter* were identified in high proportion. The relative abundance of bacterial genera and species, as well as the changes along the MAC



maturation process varied from dairy to cheese. The information obtained allowed the identification of key points of microbiological contamination in MAC processing, showing that quality and safety control programs should be adopted by these producers. The maturation period has an influence on the microbiological characteristics, since during this period there was a reduction in the counts of total coliforms, aerobic mesophiles, *E. coli* and *S. aureus*. Through this research, initial information was obtained about the bacterial diversity of the MAC Entre Serras. New studies are still needed to enable the development of the productive sector, to value the traditional production in this region and to encourage the improvement of cheese quality, to guarantee its commercialization throughout Brazil.

Keywords: Maturation. High performance sequencing. Artisanal cheese.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Localização geográfica da região das Entre Serras. A, Localização do estado de Minas Gerais (MG) no Brasil. B, região Entre Serras composta pelos municípios Santa Bárbara, Caeté, Catas Altas e Barão de Cocais.....	21
Figura 2 - Queijo Minas artesanal da Entre Serras maturando em prateleiras de madeiras.....	22
Figura 3 - Produção diária de leite (L) nas propriedades rurais da região das Entre Serras.....	52
Figura 4 - Tempo de experiência dos produtores na fabricação do queijo Minas artesanal na região das Entre Serras.....	53
Figura 5 - Tempo de maturação do queijo Minas artesanal utilizado pelos produtores da região das Entre Serras.....	55
Figura 6 - Abundância relativa (%) dos principais gêneros (A) e espécies (B) bacterianas encontrados nos queijos artesanais Minas Entre Serras produzidos por quatro queijarias (A, B, C, D). Os resultados foram obtidos com base em HTS de 16S rRNA. ....	71
Figura 7 – Perfil da microbiota bacteriana em queijos de diferentes produtores (A, B, C, D) localizados na região de Entre Serras ao longo do tempo e maturação. A, Abundâncias relativas (%) dos principais gêneros identificados nos queijos ao longo do período de maturação de 60 dias. B, Abundâncias relativas (%) das principais espécies identificadas nos queijos ao longo do período de maturação de 60 dias. ..	79
Figura 8 - Microbioma de amostras de queijo artesanal Minas Entre Serras das queijarias A, B, C e D com base na identificação das espécies .....	80
Figura 9 - Índices de diversidade alfa (Chao1) de comunidades microbianas (A: gênero; B: espécie) identificados em amostras de queijo artesanal Minas Entre Serras (n = 28) obtidas em quatro queijarias (A, B, C, D). O teste T/ANOVA indica diferenças significativas quando $p < 0,05$ .....	78
Figura 14 - Análise de coordenadas principais (PCoA) plotagem de comunidades microbianas (A: gênero; B: espécies) identificadas em amostras de queijo Minas artesanal Entre Serras (n = 28) obtidas de quatro queijarias (A, B, C, D). Os valores de PERMANOVA são indicados (F, R <sup>2</sup> e p). ....	79

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Parâmetros microbiológicos para o queijo Minas artesanal. ....	40
Tabela 2 - Localização e tempo de maturação das queijarias.....	43
Tabela 3 - Características das queijarias incluídas no estudo.....	48
Tabela 4 - Contagem de mesófilos aeróbios, coliformes totais, <i>Escherichia coli</i> e <i>S. aureus</i> e detecção de <i>Salmonella</i> sp. e <i>L. monocytogenes</i> de queijo Minas artesanal Entre Serras obtida em queijarias selecionadas. ....	56
Tabela 5 - Valores médios das contagens de <i>E. coli</i> , <i>S. aureus</i> , mesófilos aeróbios e coliformes totais das diferentes etapas da produção de queijo Minas artesanal Entre Serras.....	60
Tabela 6 - Contagem de coliformes totais, <i>E. coli</i> , <i>S. aureus</i> , mesófilos aeróbios em log UFC/g e detecção de <i>Salmonella</i> sp e <i>L. monocytogenes</i> durante a maturação no produtor A.....	63
Tabela 7 - Contagem de coliformes totais, <i>E. coli</i> , <i>S. aureus</i> , mesófilos aeróbios em log UFC/g e detecção de <i>Salmonella</i> sp e <i>L. monocytogenes</i> durante a maturação no produtor B.....	63
Tabela 8 - Contagem de coliformes totais, <i>E. coli</i> , <i>S. aureus</i> , mesófilos aeróbios em log UFC/g e detecção de <i>Salmonella</i> sp e <i>L. monocytogenes</i> durante a maturação no produtor C. ....	64
Tabela 9 - Contagem de coliformes totais, <i>E. coli</i> , <i>S. aureus</i> , mesófilos aeróbios em log UFC/g e detecção de <i>Salmonella</i> sp e <i>L. monocytogenes</i> durante a maturação no produtor D. ....	64
Tabela 10 - Médias de contagens das queijarias controle e contaminadas. ....	67
Tabela 11 - Dados metagenômicos de queijos artesanais Entre Serras (n = 28). ....	70

## LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Histórico e evolução das legislações de queijos artesanais brasileiros aplicáveis ao produto.....	24
--	----

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO .....	14
2. OBJETIVOS .....	17
2.1. Objetivo Geral .....	17
2.2. Objetivos Específicos .....	17
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....	18
3.1. Características dos queijos artesanais .....	18
3.2. Queijo Minas artesanal das Entre Serras .....	21
3.3. Desenvolvimento da legislação brasileira sobre queijos artesanais .....	23
3.4. Maturação dos queijos artesanais .....	34
3.5. Microrganismos indicadores de qualidade segurança e patógenos em queijo Minas artesanal .....	37
4. MATERIAL E MÉTODOS .....	42
4.1. Diagnóstico .....	42
4.2. Coleta de Amostras .....	42
4.3. Análises microbiológicas .....	43
4.3.1. Enumeração de coliformes totais e <i>Escherichia coli</i> .....	44
4.3.2. Enumeração de <i>Staphylococcus aureus</i> .....	44
4.3.3. Enumeração de mesófilos Aeróbios .....	43
4.3.4. Detecção de <i>Listeria monocytogenes</i> .....	45
4.3.5. Detecção de <i>Salmonella</i> sp. ....	45
4.4. Identificação de Pontos de Contaminação .....	45
4.4.1. Seleção dos produtores .....	45
4.4.2. Coleta de amostras para análises microbiológicas .....	46
4.4.2.1. Amostras líquidas e sólidas .....	46
4.4.2.2. “Swab” de equipamentos .....	47
4.4.2.3. “Swab” de mãos de colaboradores .....	47
4.5. Avaliação dos queijos Minas artesanal das Entre Serras durante o período de maturação .....	47
4.5.1. Definição e coleta das amostras .....	47
4.5.2. Análises microbiológicas .....	48
4.6. Biodiversidade de bactérias lácticas dos queijos Minas Artesanais .....	48

4.6.1. Isolamento de bactérias lácticas de queijos Minas Artesanais.....	48
4.6.2. Identificação das bactérias lácticas isoladas de queijo Minas artesanal por técnicas de biologia molecular .....	49
4.6.2.1. Extração e sequenciamento do DNA total obtido dos queijos .....	49
4.6.2.2. Análise de dados .....	50
4.6.2.3. Tratamentos estatísticos .....	50
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	52
5.1 Diagnóstico.....	52
5.2 Análises microbiológicas dos queijos Minas artesanal das Entre Serras .....	56
5.3 Identificação de Pontos de Contaminação .....	58
5.4 Queijos Minas artesanal das Entre Serras durante o período de maturação .....	62
5.5 Biodiversidade bacteriana do queijo Entre Serras.....	69
5.5.1 Identificação por sequenciamento de alto desempenho .....	69
6. CONCLUSÃO.....	81
7. REFERÊNCIAS.....	83

## 1. INTRODUÇÃO

A produção de queijo artesanal está atrelada a identidade sociocultural e gastronômica de uma população, apresentando variações quanto às suas características físico-químicas, sensoriais e microbiológicas. O queijo Minas artesanal (QMA) é um dos queijos mais conhecidos e apreciados pelos consumidores brasileiros. O começo de sua produção ocorreu com a chegada dos portugueses em Minas Gerais, no século XVIII, que introduziram suas técnicas de fabricação originárias de Portugal, passando por modificações, de acordo com cada região produtora do estado (Iphan, 2006). No ano de 2006, o queijo Minas artesanal foi reconhecido pelo Instituto do Patrimônio Histórico e Artístico Nacional (IPHAN) devido ao seu histórico cultural, sua forma artesanal de produção e sua importância econômica para a região.

O Estado de Minas Gerais é o maior produtor de queijo do Brasil e também é o estado que mais se esforçou para regulamentar a produção e comercialização de queijos artesanais (Kamimura, Magnani, et al., 2019; Martins et al., 2015), tendo reconhecido oficialmente diversas regiões produtoras. Desde o início de 2000, a legislação brasileira regula a produção e a venda de queijos artesanais, durante esse período, as agências federais e estaduais de agricultura estabeleceram muitas diretrizes e leis, que recentemente foram revisadas por Kamimura, Magnani, et al. (2019) e Araújo, Camargo, et al. (2020). Considerando as normas estabelecidas em Minas Gerais, outras regiões do estado estão em processo para obterem o reconhecimento como produtoras de QMA pelo Instituto Mineiro de Agropecuária (IMA, 2020).

Independente da região produtora, a produção do QMA segue os mesmos procedimentos básicos: o coalho e uma cultura natural de iniciação são adicionados ao leite cru de vaca. A cultura natural de iniciação pode ser o “pingo” (o soro obtido após o dessoramento do queijo) ou “rala” (obtido após corte do queijo após um curto período de maturação). Depois que o leite coagula, a coalhada é cortada, agitada, drenada, moldada sob pressão, salgada a seco e sujeita a maturação à temperatura ambiente (Kamimura et al., 2020; Sant'Anna et al., 2019). A produção está associada a tradições culturais e regionais transmitidas às famílias há gerações. Embora os procedimentos de produção sejam semelhantes, diferentes tipos de QMA

podem ter características sensoriais distintas, devido a propriedades específicas de produção e geoclimáticas. Esses fatores determinam a composição de microbiomas específicos, bem como a identidade de cada queijo artesanal produzido em Minas Gerais (Perin et al., 2017).

O período de maturação do QMA é muito importante visto que as comunidades microbianas auxiliam na determinação do sabor, aroma, textura e no controle de patógenos. A produção de ácidos orgânicos, que resulta na mudança de pH do meio, aliados ao baixo potencial de oxi-redução, bem como a competição por nutrientes pelos microrganismos, controlam a multiplicação e composição da microbiota dos queijos. Além disso, durante o período de maturação, ocorre produção de peróxido de hidrogênio, dióxido de carbono, acetaldeído, diacetil e bacteriocinas por bactérias lácticas (BAL), o que também contribui para o controle de patógenos (McSweeney et al., 2017).

O microbioma do QMA já foi avaliado usando diversas metodologias. Métodos independentes de cultura têm uma vantagem, pois permitem a identificação de muitos gêneros e espécies que geralmente não são detectados por métodos dependentes de cultura. Usando o sequenciamento de alto desempenho (HTS) que tem como alvo o gene 16S rRNA, Kamimura, De Filippis, Sant'Ana e Ercolini (2019) mostraram a predominância de BAL no QMA. Kamimura et al. (2020) e Sant'Anna et al. (2019) usaram o HTS para demonstrar que a localização geográfica e a cultura inicial desempenham papéis importantes no estabelecimento da microbiota láctica encontrada no QMA.

Novas regiões foram reconhecidas como produtoras de QMA no estado de Minas Gerais, mas até agora pouco se sabe sobre suas assinaturas microbianas. O QMA Entre Serras é produzido em uma região montanhosa que inclui quatro cidades: Caeté, Barão de Cocais, Santa Bárbara e Catas Altas. A produção deste queijo remonta ao século XVIII, quando começaram as escavações de mineração em Minas Gerais (denominada "O Período do Ouro"). A produção do queijo Entre Serras quase desapareceu na década de 1950, mas, à medida que o interesse no patrimônio cultural e nas culturas alimentares tradicionais aumentou, Minas Gerais trouxe a produção de volta à vanguarda como uma alternativa para os produtores de leite.

Devido à falta de dados científicos sobre o QMA Entre Serras, são necessários estudos para caracterizar adequadamente o processo de produção, o



perfil da microbiota dos queijos e suas mudanças ao longo do tempo de maturação. Esses dados são essenciais para garantir a qualidade e segurança dos queijos produzidos, mas também para determinar a identidade do queijo Entre Serras, a fim de apoiar os produtores e obter reconhecimento e certificações.

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1. Objetivo Geral**

Caracterizar a qualidade e a inocuidade microbiológica do QMA Entre Serras, investigar os pontos-chave da contaminação em sua cadeia de produção, estudar o perfil microbiológico durante a maturação e caracterizar a sua biodiversidade.

### **2.2. Objetivos Específicos**

- Realizar um diagnóstico, por meio da aplicação de questionário e visitas técnicas, em diferentes produtores de queijo artesanal, na região das Entre Serras, para entender como diferentes produtores dessa região estão inseridos na cadeia de produção;
- Realizar a caracterização microbiológica de amostras de queijos Minas artesanal Entre Serras;
- Investigar as prováveis fontes de contaminação dos queijos por microrganismos indicadores e patógenos dentro da cadeia produtiva;
- Verificar o período mínimo de maturação do queijo Minas artesanal da região das Entre Serras, para que o mesmo atingisse os critérios microbiológicos exigidos pela legislação vigente;
- Identificar o perfil da microbiota bacteriana durante a maturação do queijo Entre Serras por sequenciamento de alto desempenho.

### **3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

#### **3.1. Características, produção e microbiota dos queijos artesanais**

Os queijos artesanais são produzidos em queijarias podendo utilizar o leite não pasteurizado para a sua elaboração, segundo a Resolução nº 07, de 28 de novembro de 2000 do MAPA (Brasil, 2000). A elaboração do QMA, no estado de Minas Gerais, é realizada a partir do leite cru, integral e recém-ordenhado, em que se utiliza o processo manual para a sua prensagem. O produto final apresenta cor, sabor e consistência própria, com massa uniforme, de acordo com a cultura da região em que foi produzido (Minas Gerais, 2002a). Seu processamento deve iniciar-se em um prazo de até 90 minutos após o início da ordenha e o leite utilizado não pode ter sofrido tratamento térmico. Podem ser utilizados ingredientes como culturas lácticas naturais (“pingo”, soro fermentado ou sorofermento), coalho e sal (Minas Gerais, 2002b).

Os queijos artesanais produzidos com leite cru apresentam texturas, sabores e aromas únicos, resultado da ligação que possuem com os diferentes territórios, climas, pastos, modos e tradições do fazer artesanal de cada região. Apresentam por isso uma rica diversidade de sabores, que variam entre as regiões, com as estações do ano e entre produtores.

Dados de 2015 indicam que a produção de leite voltada a fabricação de queijo no Brasil foi de 11 bilhões de litros, o que equivale a quase metade da produção do leite no país. No ano de 2017 foram produzidas mais de um milhão de toneladas de queijos em todo o território nacional, sendo o consumo desse produto de aproximadamente 5,5 quilos por habitante, por ano (Associação Brasileira Indústria de queijo, 2017). O estado de Minas Gerais é o maior produtor de queijo do Brasil, e dentro do estado, a região Centro-Sul destaca-se entre as demais devido a produção de queijo artesanal. Entre os queijos artesanais produzidos no país, o QMA é o mais tradicional e antigo, já que sua produção começou com os portugueses no século XVIII.

De acordo com a Lei nº 23.157 de 18 de dezembro de 2018, enquadra-se como QMA “o queijo elaborado com leite integral fresco e cru, com características de

identidade e qualidade específicas” (Minas Gerais, 2018). Este produto é classificado como um tipo de queijo semi-duro, sendo o valor de sua umidade de até 45,9% (Minas Gerais, 2008).

O QMA é produzido em dez regiões de Minas Gerais com certificação de origem: Campo das Vertentes, Araxá, Canastra, Cerrado, Serro, Serra do Salitre, Triângulo Mineiro, Alagoa, Mantiqueira de Minas e Serras da Ibitipoca (IMA, 2020). Segundo a Empresa de Assistência Técnica e Extensão Rural do Estado de Minas Gerais (Emater-MG) (2017), há no Estado cerca de 30.000 produtores de queijos artesanais, sendo que 9.000 são produtores de QMA e estão localizados nas dez regiões, produzindo anualmente 50 mil toneladas de queijo. Ao todo, 503 municípios em todo estado abrigam esses produtores de queijo artesanal, originando 250 toneladas de queijo diariamente (Embrapa, 2018).

O modo de fabricação desses queijos faz com que a fermentação seja conduzida por bactérias presentes da pastagem, pele do animal, utensílios, superfícies e outros ambientes que possam ter contato com o queijo durante a fabricação. O interesse no estudo da microbiota de queijo de leite cru vem da necessidade de caracterizar suas populações e identificar os microrganismos responsáveis por suas características sensoriais (Wouters, et al. 2002). A partir das fontes mencionadas acima podem ser isoladas BAL dos gêneros *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Leuconostoc*, *Enterococcus*, entre outras. Alguns destes micro-organismos apresentam potencial biotecnológico e, portanto, são de grande interesse para a indústria de alimentos.

As BAL foram identificadas como o principal grupo microbiano presente em queijos artesanais, considerados fontes de novas estirpes desse grupo de bactérias. Organismos de gênero *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Leuconostoc* e *Enterococcus* são considerados os mais comuns (Fox et al., 2000). As BAL naturalmente presentes no leite cru ou intencionalmente adicionadas ao leite cru durante o processo de fabricação do queijo estão associadas a propriedades como sabor, textura e aroma, além de contribuírem para inocuidade destes produtos. BAL são amplamente utilizadas como culturas iniciadoras na indústria de laticínios (Carr et al., 2002).

Martins et al. (2018) estudaram a microbiota de queijos artesanais produzidos na região amazônica. Os resultados deste estudo foram contagens médias de BAL variando de 7,32 a 8,84 UFC.g<sup>-1</sup>. Além disso, foram identificados

membros dos gêneros *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Weissella*, *Enterococcus* e *Leuconostoc*, microrganismos que são frequentemente encontrados em queijos, bem como outras espécies não usuais, como *Macrococcus caseolyticus* e *Corynebacterium variabile*.

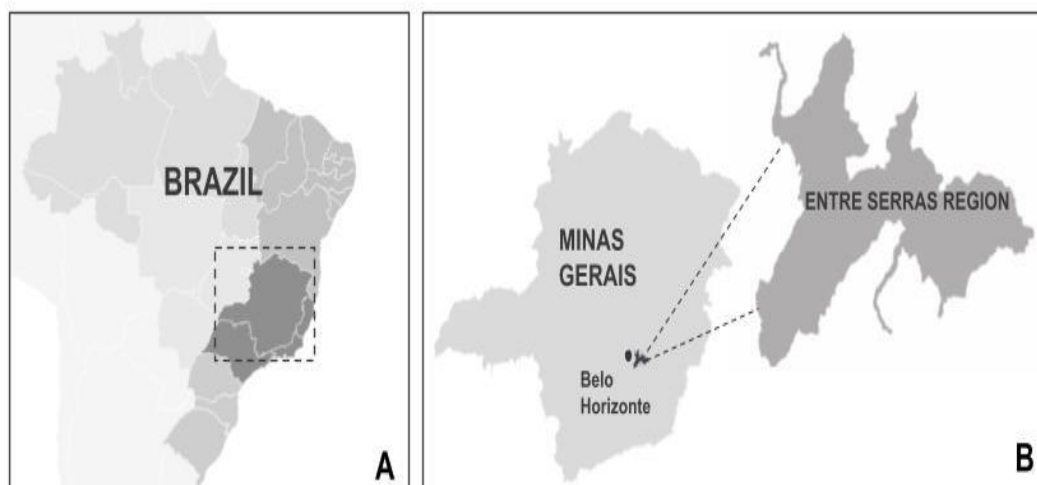
Existem outros grupos de micro-organismos que também contribuem com características desejáveis em determinados tipos de queijos, em um estudo realizado foi investigado a biodiversidade de isolados de *Propionibacterium* em fazendas produtoras de leite que produziam queijos do tipo suíço no estado de Minas Gerais. Os resultados mostraram considerável diversidade genética das *Propionibacteria* das fazendas produtoras. Os microrganismos isolados de diferentes propriedades mostraram perfis genéticos diferentes, sugerindo que cada localidade representava um nicho específico. Além disso, o estudo demonstrou que o ambiente das explorações leiteiras e a produção de leite foram um reservatório para as estirpes de *Propionibacterium* (Freitas et al., 2015).

A produção de QMA começou a ser regulamentada em 2002 com uma legislação estadual específica (Minas Gerais, 2002a). Essa regulamentação foi desenvolvida para retirar da informalidade um produto muito apreciado pelos consumidores e que têm um importante significado social, econômico e cultural. Daí surgiu o interesse em preservar a produção do QMA no Brasil. A maioria dos estudos relacionados a este produto estão focados em suas características tecnológicas, sensoriais ou em seu perfil microbiológico (Brito et al., 2008, Nogueira et al., 2005, Pinto et al., 2009). A caracterização da ecologia microbiana de matrizes alimentares complexas, como os queijos de leite cru é muito importante, pois fornece dados sobre inocuidade, tecnologia de produção e sua distinção de origem geográfica.

Estudos de caracterização de BAL de queijos artesanais são importantes para entender a diversidade de queijos produzidos em diferentes regiões. Pesquisas nessa área possibilitam a valorização de queijos artesanais, contribuindo para o desenvolvimento local. Além disso, um melhor conhecimento dos microrganismos pode facilitar a seleção de culturas que têm importância industrial, para ser utilizada na indústria de alimentos como culturas iniciais para a produção de queijos e outros produtos lácteos (Wouters et al., 2002).

### 3.2. Queijo Minas artesanal das Entre Serras

A região das Entre Serras está localizada numa área montanhosa, onde aconteceu o primeiro ciclo aurífero - o ouro de aluvião, a partir de 1640, no Estado de Minas Gerais. Essa microrregião é composta pelos seguintes municípios: Santa Bárbara, Caeté, Catas Altas e Barão de Cocais (Figura 1). O QMA Entre Serras tem esse nome porque é produzido entre as Serras da Piedade ao Caraça, sua produção é desenvolvida há mais de 300 anos, no entanto, sua fabricação quase desapareceu na década de 1950. À medida que o interesse no patrimônio cultural aumentou essa fabricação artesanal foi resgatada.



**Figura 1** - Localização geográfica da região das Entre Serras. A, Localização do estado de Minas Gerais (MG) no Brasil. B, região Entre Serras composta pelos municípios Santa Bárbara, Caeté, Catas Altas e Barão de Cocais.

Na iniciativa que reúne produtores da região Entre Serras para obter o reconhecimento oficial de região produtora de QMA, técnicos da Emater - MG e do Instituto Mineiro de Agropecuária (IMA) trabalham na definição das características dessa provável nova região queijeira. Além disso, trabalham na qualificação dos produtores locais, que devem manter o processo artesanal e se adequar nas regras sanitárias.

O queijo Entre Serras apresenta consistência semidura, textura compacta, branco-amarelado e sabor brando, sendo menos ácido que o do Serro e menos

adocicado que o da Canastra. Porém, sua produção ainda precisa ser aprimorada e as técnicas de produção necessitam ser padronizadas (Figura 2).



Fonte: Autor

**Figura 2** - Queijo Minas artesanal da Entre Serras maturando em prateleiras de madeiras.

A fabricação dos QMA é uma tradição secular que passa de geração em geração. É um processo manual e segue normas que abrangem a produção de queijos a partir de leite cru, beneficiados nas queijarias das propriedades rurais, sem utilização de técnicas industriais (Minas Gerais, 2002). O modo de se fazer o queijo artesanal envolve em, logo após a ordenha, submeter o leite à filtração, por meio de filtro ou tecido sintético. Em seguida, o leite é transferido para o tanque de fabricação, quando então é adicionado o “pingo” e o coalho (Minas Gerais, 2002; Minas Gerais, 2018). Após a coagulação, a coalhada é deixada em repouso por cerca de cinco minutos, seguido de agitação lenta de, aproximadamente, meia hora, até a obtenção da massa firme. A partir daí, é eliminada parte do soro e feita à compressão da massa nas formas, com as mãos. A salga é realizada inicialmente em um lado do queijo e, após duas horas, no outro lado. O “pingo” é coletado em recipiente higienizado, de um dia para o outro, para ser usado na próxima

fabricação. Os queijos são tirados da forma no dia posterior, maturados, e por fim, comercializados (Minas Gerais, 2012).

A utilização do "pingo" é uma característica marcante, sendo este conhecido como o fermento resultante da dessoragem dos queijos já salgados, e coletados de um dia para o outro, sendo, portanto, um soro fermentado com certa quantidade de sal, que pode agir como inibidor de algumas fermentações indesejáveis e confere ao queijo características físico-químicas típicas de sua variedade (Pinto, 2016).

Novas regiões foram reconhecidas como produtoras de QMA no estado de Minas Gerais, e a região das Entre Serras está em busca de reconhecimento. No momento em que o QMA Entre Serras obtiver o reconhecimento em relação a sua identidade e aos parâmetros de qualidade e inocuidade, a sua certificação poderá ser definitivamente implementada, gerando importantes avanços para a região produtora.

### **3.3. Desenvolvimento da legislação brasileira sobre queijos artesanais**

A criação da obrigatoriedade de fiscalização industrial e sanitária dos produtos de origem animal, objetivando tornar a produção desses alimentos mais homogênea, e a fim de garantir a qualidade e inocuidade dos produtos manufaturados pelas indústrias do setor de alimentos, veio com a Lei 1.283 de 1950 (Brasil, 1950) e o Decreto Lei 30.691 de 1952 (Brasil, 1952). Com o Regulamento e Inspeção Industrial e Sanitária de produtos de Origem Animal (RIISPOA), veio a criação do Serviço de Inspeção Federal (SIF), tornando possível a comercialização dos produtos de origem animal fora do estado originário de produção. Para o estabelecimento receber o selo do SIF, o mesmo passa por muitas fases de fiscalização e inspeção, realizadas pelo Departamento de Inspeção de Produtos de Origem Animal (Dipoa), da Secretaria de Defesa Agropecuária (SDA/Mapa) (Mapa, 2017).

Os produtos artesanais e industriais eram fiscalizados e inspecionados da mesma forma. Este descompasse gerou dificuldade para que a maioria dos produtores artesanais comercializarem de seus produtos, já que a quantidade, o modo de produção e controle de qualidade para adequação aos parâmetros exigidos por lei distanciava-se do modo de produção industrial.



Os produtores de queijo artesanal fazem parte dos que buscam pela heterogeneidade da legislação, visto que o modo de produção, quantidade e controle de qualidade diferem-se dos queijos produzidos de forma industrial (Braga, 2018). A partir da criação do RIISPOA, novas regulamentações específicas para produção e comercialização de queijos artesanais tem sido publicadas em todo o território brasileiro, como pode ser visto no Quadro 1.

**Quadro 1:** Histórico e evolução das legislações de queijos artesanais brasileiros aplicáveis ao produtor.

<b>Legislação</b>	<b>Origem</b>	<b>Principais pontos</b>
Lei 1.283, de 18 de dezembro de 1950	Federal	Torna obrigatória a fiscalização industrial e sanitária de produtos de origem animal comestíveis e não comestíveis.
Decreto Lei 30.691, de 29 de março de 1952 (Revogado pelo Decreto nº 9.013, de 29/3/2017)	Federal	Criação do RIISPOA – Regulamento da Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal. Selo SIF – Serviço de Inspeção Federal – comercialização entre estados.
Lei 7.889, de 13 de novembro de 1989	Federal	Complementa a Lei 1.283/1950: Ministério da Agricultura fiscaliza o comércio interestadual e internacional. Secretarias dos Estados, Distrito

		Federal e dos Territórios fiscalizam comércio intermunicipal. Secretarias ou Departamentos de Agricultura dos Municípios fiscalizam comércio municipal.
Portaria 146, de 7 de março de 1996	Federal	Regulamentos Técnicos de Identidade e Qualidade dos Produtos Lácteos. Queijo feito com leite não pasteurizado deve ter processo de maturação a uma temperatura superior aos 5°C, durante um tempo não inferior a 60 dias.
Resolução 07, de 28 de novembro de 2000	Federal	Oficializa os critérios de funcionamento e de controle da produção de Queijarias, para seu relacionamento junto ao SIF. Queijo Minas pode ser produzido a partir de leite cru e só poderá ser comercializado para o consumo após 60 dias de cura ou maturação

		em entreposto de laticínios registrado no SIF.
Instrução Normativa 30, de 26 de junho de 2001	Federal	Regulamentos Técnicos de Identidade e Qualidade de Manteiga da Terra ou Manteiga de Garrafa; Queijo de Coalho e Queijo de Manteiga.
Lei Estadual 14.185, de 31 de janeiro de 2002 (Revogada pela Lei Nº 20549 DE 18/12/2012)	Minas Gerais	Normas para o Processo de Produção de queijo Minas artesanal, construção e funcionamento das queijarias artesanais; características físico-químicas e microbiológicas do leite e queijo; cadastramento IMA.
Decreto 42.645, de 05 de junho de 2002	Minas Gerais	Aprova Regulamento da Lei 14.185, de 31 de janeiro de 2002.
Portaria 517, de 14 de junho de 2002	Minas Gerais	Normas de defesa sanitária para rebanhos fornecedores de leite para produção de queijo Minas artesanal.
Portaria 518, de 14 de junho de 2002	Minas Gerais	Requisitos básicos das instalações, materiais e equipamentos para a fabricação do queijo

		Minas artesanal.
Portaria 523, de 04 de julho de 2002	Minas Gerais	Normas sobre as condições higiênico-sanitárias e boas práticas na manipulação e fabricação do queijo Minas artesanal.
Decreto Estadual 44.864, de 01 de agosto de 2008	Minas Gerais	Altera o Regulamento da Lei 14.185, de 31 de janeiro de 2002. Alteração de características físico-químicas e microbiológicas. Permitida a comercialização de queijo Minas artesanal no estado de MG, desde que cadastrado no IMA.
Lei 19.583, de 17 de agosto de 2011	Minas Gerais	Manipulação e o beneficiamento artesanais de leite de cabra e de ovelha e de seus derivados.
Instrução Normativa 57, de 15 de dezembro 2011	Federal	Estabelece que a maturação de queijos artesanais pode ser inferior ao período de 60 dias em todo o país, desde que estudos técnico-científicos comprovem que a

		redução desse período não compromete a qualidade e a inocuidade do produto.
Lei Estadual 20.549, de 18 de dezembro de 2012 (Revogado pela Lei Nº 23157 DE 18/12/2018)	Minas Gerais	Definição, tipos, produção e comercialização de queijo Minas artesanal. O IMA poderá credenciar associação ou cooperativa para atuar, em caráter auxiliar, na verificação de conformidade da produção dos queijos artesanais.
Instrução Normativa 30, 7 de agosto de 2013	Federal	Complementação da Instrução Normativa 57/2011. Propriedades produtoras devem ser certificadas 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, no prazo de até três anos a partir da publicação desta Instrução Normativa.
Portaria IMA 1305, de 30 de abril de 2013	Minas Gerais	Produção de queijo Minas artesanal exclusivamente a partir de leite cru de vaca, de produção própria, com utilização de soro fermento (pingo), em regiões específicas do estado de Minas Gerais. Aplica-se a somente queijarias integrantes no sistema SISBI-POA. Estabelece maturação de 17 dias para queijo do Serro e 22 dias para queijo da Canastra, queijo do Cerrado, queijo do Araxá e queijo do Campo das Vertentes.
Lei 21.429, de 21 de julho de 2014	Minas Gerais	Altera a Lei nº 19.583, de 17 de agosto de 2011, que dispõe sobre as condições para manipulação e

		<p>beneficiamento artesanais de leite de cabra e de ovelha e de seus derivados.</p> <p>Produtor deve ser cadastrado no IMA.</p>
Decreto 9.013, de 29 de março de 2017	Federal	<p>Revoga o Decreto Lei 30.691 de 29 de março de 1952. Novo RIISPOA.</p>
Portaria IMA 1736, de 27 de julho de 2017	Minas Gerais	<p>Altera a Portaria 1305, de 30 de abril de 2013, que dispõe sobre o período de maturação do Queijo Minas Artesanal.</p> <p>Estabelece tempo mínimo de maturação de 14 dias para queijo do Araxá, 17 dias para queijo do Serro e 22 dias para queijo da Canastra, do Cerrado, do Campo das Vertentes, de Serra do Salitre e do Triângulo Mineiro.</p>
Lei 13.680, de 14 de junho de 2018	Federal	<p>Selo ARTE.</p> <p>Permitida a comercialização interestadual de produtos alimentícios produzidos de forma artesanal.</p>

		<p>Submetidos à fiscalização de órgãos de saúde pública dos Estados e do Distrito Federal.</p> <p>Inspeção e a fiscalização de natureza orientadora.</p>
Lei nº 23157 de 18 de dezembro de 2018.	Minas Gerais	<p>Dispõe sobre a produção e a comercialização dos queijos artesanais de Minas Gerais.</p>
Lei nº 13.860, de 18 de julho de 2019	Federal	<p>Dispõe sobre a elaboração e a comercialização de queijos artesanais e dá outras providências.</p> <p>O queijeiro artesanal é responsável pela identidade, pela qualidade e pela segurança sanitária do queijo e deve cumprir os requisitos sanitários estabelecidos por legislação</p> <p>Entidades de defesa sanitária e de assistência técnica e extensão rural são responsáveis por orientar o queijeiro</p>



		artesanal na implantação dos programas de boas práticas agropecuárias de produção leiteira e de fabricação do queijo artesanal.
Decreto nº 9.918, de 18 de julho de 2019	Federal	Regulamenta o art. 10-A da Lei nº 1.283, de 18 de dezembro de 1950, que dispõe sobre o processo de fiscalização de produtos alimentícios de origem animal produzidos de forma artesanal. Identificação por selo único com a indicação ARTE; Definição de produto artesanal; Boas práticas agropecuárias na produção artesanal; Boas práticas na fabricação de produtos minas artesanais; Requisitos para ser um produto artesanal; Fiscalização dos produtos artesanais.
Portaria nº 1985, 1986 de 16 de junho de	Minas Gerais	Identifica a região da Mantiqueira como

2020		<p>produtora do Queijo Artesanal Mantiqueira de Minas.</p> <p>Identifica o município de Alagoa como produtor do Queijo Artesanal de Alagoa</p>
Portaria Nº 2016, de 26 de novembro de 2020	Minas Gerais	<p>Identificar a Região Serras da Ibitipoca como Produtora do Queijo Minas Artesanal.</p>
Portaria Nº 2051, de 7 de abril de 2021	Minas Gerais	<p>Fica definido o período de maturação do queijo Minas Artesanal como mínimo de 14 dias para a microrregião de Araxá, Canastra e Serra do Salitre, mínimo de 17 dias para a microrregião do Serro e para as demais regiões do Estado, o período mínimo de maturação será de 22 dias ou pelo maior período especificado em estudos científicos</p>

### 3.4. Maturação dos queijos artesanais

A Resolução nº 7, de 28 de novembro de 2000, considerava que o queijo Minas produzido a partir de leite cru deveria ser comercializado apenas após um período mínimo de maturação de 60 dias (Brasil, 2000). Porém, este período comprometia a qualidade sensorial do produto e com um período inferior a este imposto, impossibilitava a comercialização nos demais estados (Dores; Ferreira, 2012).

Neste sentido, estudos foram realizados verificando o tempo mínimo de maturação para atender a legislação vigente. Ao analisar queijo Minas artesanal do Serro de oito produtores, Martins (2006) verificou que 17 dias de maturação era o tempo necessário para atingir os parâmetros microbiológicos legais, enquanto Dores (2007) observou que para a redução da microbiota patogênica seria necessário o período de 22 dias de maturação à temperatura ambiente para o queijo Minas artesanal da Canastra. Sales (2015), ao analisar amostras de seis produtores da região de Araxá, identificou que 14 dias de maturação era suficiente para atender os requisitos exigidos. A partir destes estudos o período de maturação vigente do queijo Minas artesanal é de no mínimo 14 dias para a microrregião de Araxá, 17 dias para a microrregião do Serro e 22 dias para as microrregiões da Canastra, Cerrado, Campo das Vertentes, Serra do Salitre e Triângulo Mineiro, até que sejam realizadas novas pesquisas ratificando ou retificando os tempos mínimos de maturação (Minas Gerais, 2017).

O estudo da maturação do queijo Minas artesanal é realizado para verificar o efeito deste processo sobre as características sensoriais, físico-químicas e microbiológicas. Essa fase é responsável pelo desenvolvimento da cor, sabor, aroma e textura característicos do produto devido a alterações bioquímicas como lipólise, proteólise e glicólise na matriz do queijo (Fox, 1997; Dores, 2007; Silva, 2007).

A lipólise ocorre por ação de enzimas lipolíticas, denominadas lipases. Estas podem provir do leite, do coagulante, do fermento lácteo, das *Non Starter Lactic Acid Bacteria* (NSLAB), de microrganismos acompanhantes e de preparações de lipases exógenas (Fox et al., 2000; McSweeney; Souza, 2000). No processo de maturação dos queijos a primeira alteração sofrida pelo material lipídico é a hidrólise dos

triglicerídeos com liberação e acúmulo de ácidos graxos no meio. São esses ácidos graxos que contribuirão com a formação de sabor e aroma do produto (Collins; McSweeney; Wilkinson, 2003; Collins; McSweeney; Wilkinson, 2004; Ordóñez et al., 2005).

O principal açúcar dos queijos é a lactose, e sua degradação por meio da fermentação láctica, inicia-se antes da coagulação e continua durante a maturação. Em torno de 98% da lactose é removida com o soro e a lactose residual é degradada por bactérias do próprio leite ou da cultura láctica, produzindo ácido láctico. O metabolismo da lactose residual é essencial para a formação de queijos de boa qualidade (Fox et al., 1997). Assim, produção do QMA tem como etapa inicial a acidificação do leite e da coalhada a partir da degradação da lactose, por cepas de BAL que transformam o carboidrato em ácido láctico. A principal função das BAL neste processo é a conversão da lactose do leite em ácido láctico. A produção de ácido láctico contribuirá para o rápido abaixamento do pH, afetando desta forma significativamente a multiplicação de patógenos e microrganismos deteriorantes (Ordóñez, 2005). Além disso, a ação do coalho e a acidificação favorecem a retirada de soro da coalhada, contribuindo assim para a preservação do produto pela redução do teor de umidade (Eck, 1987).

Dos três principais eventos bioquímicos na maturação de queijos, a proteólise é o mais complexo e o que possui o maior grau de importância. Ela é considerada a principal reação de formação de peptídeos e aminoácidos livres durante a maturação (Visser, 1993). A proteólise pode ser definida como a hidrólise das caseínas por meio da ação proteolítica das enzimas presentes no coagulante residual retido na coalhada e das proteinases naturais presentes no leite, o que resulta na produção de grande quantidade de peptídeos de massa molecular elevada e média (primeira fase da proteólise). Estes vão ser hidrolisados a peptídeos pequenos e aminoácidos pelas proteinases do fermento lácteo, das NSLAB e de fontes exógenas (McSweeney, 2004; Upadhyay et al, 2004).

Na primeira etapa ocorre a quebra das caseínas em longas cadeias peptídicas por ação das endopeptidases, que são as proteases, essa quebra afeta a consistência do queijo. A segunda etapa é marcada pela quebra dos peptídeos menores pela ação de carboxipeptidases e aminopeptidases em aminoácidos livres que contribuirão para o sabor do queijo. Na terceira etapa, a transformação dos aminoácidos livres ocorre por meio de uma série de enzimas catabólicas que

dependem da cultura lática secundária e das condições físico-químicas, principalmente do pH do queijo, formando compostos aromáticos da degradação destes aminoácidos em aminas, aldeídos, álcoois, lactonas e cetonas, ésteres, compostos fenólicos e sulfurados (Alais, 2003).

A proteólise, sendo o parâmetro mais utilizado como indicador de maturação, pode ser expressa por meio de índices de extensão e profundidade de maturação. No entanto, não há uma divisão precisa onde começa um índice e termina o outro (Narimatsu et al., 2003). O índice da extensão da maturação quantifica ou mensura os peptídeos (solúveis) de alta massa molecular, produto da ação proteolítica das enzimas do coalho sobre as caseínas do queijo, sendo liberados para a fase aquosa deste (Wolfschoon-Pombo; Lima, 1989). A extensão é um fator indicativo da proteólise primária (Bech, 1993).

O índice de profundidade de maturação tem a finalidade de verificar a formação de substâncias de baixo massa molecular acumuladas durante o período de maturação, principalmente por causa da ação proteolítica das enzimas microbianas sobre compostos nitrogenados oriundos da degradação da caseína. Compostos característicos dessa degradação são os aminoácidos, oligopeptídeos e aminas (Silva et al., 1995). Estes compostos são os peptídeos resultantes da ação do coalho e da plasmina sobre as caseínas (Fox, 1989). Esse índice está relacionado principalmente com a atividade das endo e exoenzimas da cultura lática empregada na fabricação do queijo e de possíveis contaminantes, que degradam os peptídeos de alta e média massa molar, oriundos da degradação da caseína, em peptídeos de baixa massa molar, os quais em excesso, conferem o sabor amargo aos queijos (Oliveira, 2013; Ferreira, 2004; Moreno et al., 2002; Narimatsu et al., 2003; Perotti et al., 2004).

O processo de maturação do queijo depende, principalmente, de três fatores: 1) temperatura e umidade da atmosfera em contato com o queijo; 2) composição química da coalhada, como teor de gordura, aminoácidos, ácidos graxos, e outros produtos da ação enzimática; e 3) microbiota residual da coalhada, presente na cultura starter, no leite original utilizado e seu ambiente. Já o aumento ou redução dessa microbiota depende pelo menos de cinco fatores: 1) umidade da coalhada; 2) temperatura de armazenamento; 3) pH da coalhada; 4) substâncias inibidoras da coalhada; e 5) potencial de óxido-redução (Robinson & Wilbey; 2002).

Além das alterações bioquímicas, a microbiota associada ao leite cru

também tem um papel muito importante no desenvolvimento das características sensoriais dessa fase, sendo essa microbiota composta, principalmente, por BAL (Montel et al., 2014; Perin et al., 2017). Esta fase é de grande importância nesse tipo de queijo pois pode reduzir a carga de microrganismos patogênicos, como *S. aureus*, *L. monocytogenes*, *Salmonella* sp. e outros microrganismos pertencentes à família Enterobacteriaceae, que podem influenciar negativamente na qualidade e inocuidade microbiológica do produto (Mata et al., 2016; Perin et al., 2017; Montel et al., 2014; Dores, Nobrega & Ferreira, 2013; Martins et al., 2015).

### **3.5. Microrganismos indicadores de qualidade e patógenos em queijo Minas artesanal**

O QMA Entre Serras é feito a partir do leite cru, que pode apresentar uma imensa variedade de microrganismos. Os microrganismos presentes no leite estão relacionados a microbiota presente tanto nas superfícies que entram em contato direto com o produto, como em fontes indiretas e são influenciados pelas características intrínsecas como a grande disponibilidade de nutrientes, pH favorável, a alta atividade de água e a temperatura de armazenamento (Vanetti & Pinto, 2013). As fontes diretas são os equipamentos da queijaria, teto do animal, tanques de refrigeração e condições de transporte. Como exemplo de fontes indiretas podem ser citados a alimentação do animal, sala de ordenha, água de lavagem dos equipamentos, material fecal presente na sala de ordenha e os manipuladores (Montel et al., 2014).

Entre as bactérias patogênicas que podem estar presentes em queijos elaborados a partir de leite cru destacam-se *Salmonella* sp., *Listeria monocytogenes*, *S. aureus*, estirpes patogênicas de *E. coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Bacillus cereus* e *Pseudomonas aeruginosa* (Andrade, 2009; Montel et al., 2014; Vanetti & Pinto, 2013). Estudos sobre a qualidade microbiológica dos queijos artesanais (Ornellas, 2012; Borelli, 2006; Martins, 2006) mostram que diversas amostras se encontravam em condições higiênicas insatisfatórias (Santos, 2010). Entre os microrganismos potencialmente capazes de contaminar esses queijos, destacam-se *E. coli*, *Staphylococcus* e suas toxinas, *Salmonella* sp. e *L. monocytogenes* (Jay, 2005).

Os coliformes são grupos de bactérias indicadoras de higiene formados por

diferentes gêneros, incluindo *Escherichia*, *Citrobacter*, *Enterobacter* e *Klebsiella*. Tais bactérias habitam os solos, vegetais, e intestino de animais, e são utilizadas na avaliação da qualidade das águas e alimentos. As bactérias do grupo coliforme diferenciam-se em totais (30°C) e termotolerantes (45°C) (Silva et. al., 2007; Franco; Landgraf, 2007). Os coliformes podem causar alterações indesejáveis no queijo, como o estufamento precoce, devido a produção de gases após a fermentação da lactose (Sobral et al., 2017).

O grupo dos coliformes totais inclui todas as bactérias na forma de bastonetes gram-negativos, não esporogênicos, aeróbios ou anaeróbios facultativos, capazes de fermentar a lactose com produção de gás, em 24 a 48 horas a temperaturas mesofílicas de 32 °C sendo encontrados em fezes, solos e vegetais (HITCHINS; Hartman; Todd, 1996; Franco; Landgraf, 2007). Os coliformes termotolerantes são bactérias gram-negativas, em forma de bacilos, oxidase-negativas, caracterizados pela atividade da enzima  $\beta$ -galactosidase. Podem multiplicar-se em meios contendo agentes tenso-ativos e fermentar a lactose nas temperaturas de 44° – 45 °C, com produção de ácido, gás e aldeído. Além de estarem presentes em fezes humanas e de animais homeotérmicos, ocorrem em solos, plantas ou outras matrizes ambientais. Neste grupo estão a *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter aerogenes* e *Citrobacter freundii* (Brasil, 2005; Silva et. al., 2007). Entre os coliformes termotolerantes, destaca-se a *E. coli*, bactéria presente no trato intestinal humano e também de animais. A presença da *E. coli* caracteriza contaminação fecal no alimento. No Brasil, essa bactéria foi a maior causadora identificada de DTAs entre os anos de 2009 e 2018 (23,4% dos surtos) (Brasil, 2019).

*Staphylococcus coagulase positivo* é um agente potencialmente patogênico que tem sido encontrado em queijos artesanais (Andrade, 2009; Perin et al., 2017). Bactérias do gênero *Staphylococcus* podem ser caracterizadas como cocos Gram positivos, pertencentes à família Micrococcaceae. São anaeróbias facultativas, mesófilas (com temperatura ótima de crescimento a 37 °C), halotolerantes (toleram concentrações de NaCl de 10 a 20%), e multiplicam-se na faixa de pH de 4 a 9,8, com atividade de água mínima de 0,83 (Silva et. al., 2007). *Staphylococcus* podem produzir enterotoxinas e quando presentes em quantidade superior a 10<sup>6</sup> UFC/g ou mL podem provocar intoxicações alimentares (Vanetti & Pinto, 2013). De acordo com Pelisser et al. (2009), a presença desse microrganismo nos alimentos dá-se

pela manipulação excessiva e pela exposição demasiada a temperatura ambiente. No Brasil, entre os anos de 2009 e 2018, *S. aureus* foi o terceiro maior agente etiológico maior causador de DTA (9,4% dos surtos) (Brasil, 2019). No caso de queijos artesanais, esse microrganismo pode ser transmitido por meio do leite devido a mastite bovina, falta de higiene dos colaboradores, ou por manipulação inadequada (Johler et al., 2018). Em estudo realizado por Dores, Nobrega e Ferreira (2013), esse microrganismo foi peça chave para definir o tempo de maturação do queijo para que fosse considerado seguro para o consumo humano.

*Salmonella* sp. é caracterizada como pequenos bacilos Gram negativos, não esporogênico, anaeróbios facultativos, catalase positiva, oxidase negativa, e em geral são móveis. O pH para multiplicação pode ser entre 4 e 9 com ótimo próximo da neutralidade enquanto a temperatura de multiplicação ótima é de 36 °C podendo multiplicar-se de 7 °C a 47 °C e Aa mínima de 0,94 (Franco; Landgraf, 2008; Silva et. al., 2011; Resende, 2014). A presença de *Salmonella* sp. foi observada em algumas pesquisas realizadas em queijos tradicionais no Brasil (Nassu et al., 2000; Feitosa et al., 2003). Esse microrganismo está envolvido em muitos surtos associados ao consumo de alimentos contaminados em vários países, sendo que no Brasil, foi o segundo maior agente causador de doenças associadas ao consumo de alimentos contaminados entre os anos de 2009 e 2018 (11,3%) (Brasil, 2019). Entretanto, entre os anos de 2000 e 2017 ela liderou o ranking, sendo responsável por aproximadamente 31% das DTAs (Brasil, 2019; Finger, 2019). *Salmonella* sp. pode ser encontradas em fezes de animais hospedeiros, contaminando assim o solo e a água (Shinohara et al., 2008).

*Listeria* sp. podem ser caracterizadas como bastonetes gram-positivo curto com extremidades arredondadas e móvel a temperatura entre 20 °C e 25 °C, anaeróbio facultativo, consegue multiplicar-se em ambientes com temperaturas entre -0,4 e 45°C e tem uma temperatura ótima de crescimento entre 30 °C e 37 °C, sobrevive por longos períodos em alimentos congelados suportando vários congelamentos e descongelamentos. Este microrganismo é capaz de tolerar alterações de pH entre 4,3 a 9,6 e altas concentrações de NaCl (até 30% dependendo da temperatura), a atividade de água ótima para sua multiplicação é de 0,97, contudo pode multiplicar-se a 0,92 (Franco; Landgraf, 2008; Silva et. al., 2007; Resende, 2014). Entre os alimentos envolvidos nos surtos de listeriose causados por *L. monocytogenes* pode-se citar o leite cru e queijos produzidos com essa matéria-



prima. Esse patógeno pode ser resistente ao período de maturação do queijo (Melo et al., 2015). Segundo Vanetti & Pinto (2013) a ocorrência de surtos de listeriose é maior em produtos lácteos devido a ingestão de leite cru ou derivados produzidos com leite cru. A contaminação do leite por esse microrganismo pode ocorrer devido à saúde do animal (mastite clínica ou sub-clínica), ambiente em que o leite é ordenhado, má higienização dos baldes de transporte do leite até a produção do queijo, salmoura, panos que auxiliam na prensagem do queijo, utensílios de produção, prateleiras, bem como no modo em que o produto é estocado (Andrade, 2009; Melo et al., 2015; Almeida et al., 2013; Dalmaso & Jordan, 2014).

O queijo Entre Serras enquadra-se na legislação de QMA descrita no Decreto nº 42.645, de 05 de junho de 2002 (Minas Gerais, 2002) e Decreto nº 44.864, de 01 de agosto de 2008 (Minas Gerais, 2008). Os parâmetros microbiológicos para esse produto podem ser observados na Tabela 1.

**Tabela 1** - Parâmetros microbiológicos para o queijo Minas artesanal.

<b>Parâmetros Microbiológicos</b>	<b>Limites</b>
Coliformes totais (UFC/g) <sup>b</sup>	n = 5; c = 2; m = 1.000; M = 5.000
Coliformes termotolerantes (UFC/g) <sup>b,*</sup>	n = 5; c = 2; m = 100; M = 500
<i>Staphylococcus</i> coagulase positiva (UFC/g) <sup>a</sup>	n = 5; c = 2; m = 100; M = 1.000
<i>Listeria</i> sp./25g <sup>a</sup>	n = 5; c = 0; m = 0
<i>Salmonella</i> sp./25g <sup>a</sup>	n = 5; c = 0; m = 0

Decreto nº 42.645, de 05 de junho de 2002 (Minas Gerais, 2002) (parâmetros com a letra <sup>a</sup>) e Decreto nº 44.864, de 01 de agosto de 2008 (Minas Gerais, 2008) (parâmetros com a letra <sup>b</sup>) \*

Mesmo com o grande mercado que esse produto artesanal vem conquistando nos últimos tempos, o conhecimento científico sobre os microorganismos indicadores de higiene e de inocuidade, o efeito da maturação diante dos patógenos, os limites microbiológicos requeridos pela legislação ainda são desconhecidos por parte dos produtores de QMA. Diante deste cenário, este trabalho teve como objetivo diagnosticar a produção de queijo Minas artesanal na região Entre Serras, e avaliar os indicadores microbiológicos das amostras de queijos minas artesanais obtidas durante o período de maturação de 60 dias.

Com isso, o estudo pode auxiliar os produtores a compreenderem melhor as normas sanitárias aplicadas a esse tipo de produto, avaliar a eficácia das boas

práticas de fabricação que estão sendo implementadas nas queijarias, observar o controle dos microorganismos indicadores de higiene e patógenos durante o período de maturação e identificar o perfil microbiológico do queijo Entre Serras. Dessa maneira, o presente estudo irá proporcionar um diagnóstico microbiológico adequado e propor as ações necessárias para a melhoria da qualidade dos queijos produzidos, além de determinar características de identidade desse produto, a fim de apoiar os produtores e obter reconhecimento e certificações.

## **4. MATERIAL E MÉTODOS**

### **4.1. Diagnóstico**

O diagnóstico socioeconômico e cultural da produção do QMA foi realizado no mês de outubro de 2018 com produtores dos municípios de Santa Bárbara, Caeté, Barão de Cocais, Catas Altas e Cocais que estão localizados na região das Entre Serras no estado de Minas Gerais, por meio da aplicação de questionário individual, que foi respondido nas propriedades produtoras de QMA. A realização do diagnóstico objetivou a obtenção do maior número de informações possíveis sobre o processo produtivo do QMA Entre Serras, visando entender como os produtores estavam inseridos na cadeia produtiva de queijos e como estavam respondendo às crescentes demandas para a produção de alimentos inócuos.

O questionário foi elaborado previamente, e dividido em tópicos (Anexo A). O questionário contou com 23 itens e abordou temas relativos ao conhecimento técnico para a obtenção de leite com qualidade, o envolvimento da família rural na produção do queijo, renda relacionada com o produto, destino do produto, cursos de qualificação, instalações do local de fabricação, processo de produção dos queijos, utilização de Boas Práticas de Fabricação (BPF), utensílios e equipamentos utilizados na fabricação dos queijos, temperatura de armazenamento, origem da água para consumo humano e para a produção e limpeza do local.

O preenchimento do questionário foi feito por meio das respostas dos produtores nos locais pesquisados. As opções de respostas eram fornecidas aos pesquisados que optavam pela que melhor atendia ao item observado.

Os dados provenientes dos 21 entrevistados foram tabulados, transformados em valores percentuais e foram construídas tabelas e histogramas, com o auxílio do programa Microsoft Office Excel®, para auxiliar na interpretação dos dados obtidos.

### **4.2. Coleta de Amostras**

Considerando os dados obtidos através da aplicação do questionário aos produtores foram selecionadas 14 queijarias para amostragem, essas queijarias foram selecionadas quanto a disponibilização de amostras para análise. As 14

amostras de queijos artesanais fabricados na região das Entre Serras, produzidos nos municípios citados no item 4.1 em diferentes condições de maturação foram coletadas com os produtores (Tabela 2), acondicionadas em caixas isotérmicas contendo gelo e transportadas sob refrigeração até o Laboratório do Inovaleite do Departamento de Tecnologia de Alimentos da Universidade Federal de Viçosa. Após o recebimento das amostras, as análises microbiológicas foram realizadas na sequência.

**Tabela 2** - Localização e tempo de maturação das queijarias.

<b>Queijo</b>	<b>Município</b>	<b>Tempo de Maturação</b>
<b>Q1</b>	Santa Bárbara	10 dias
<b>Q2</b>	Santa Bárbara	25 dias
<b>Q3</b>	Santa Bárbara	10 dias
<b>Q4</b>	Santa Bárbara	5 dias
<b>Q5</b>	Santa Bárbara	7 dias
<b>Q6</b>	Barão de Cocais	28 dias
<b>Q7</b>	Santa Bárbara	22 dias
<b>Q8</b>	Santa Bárbara	25 dias
<b>Q9</b>	Santa Bárbara	12 dias
<b>Q10</b>	Catas Altas	5 dias
<b>Q11</b>	Catas Altas	15 dias
<b>Q12</b>	Barão de Cocais	25 dias
<b>Q13</b>	Catas Altas	26 dias
<b>Q14</b>	Santa Bárbara	15 dias

### **4.3. Análises microbiológicas**

As amostras de QMA foram submetidas à enumeração de mesófilos aeróbios, coliformes totais, *E. coli*, *S. aureus*, e detecção de *L. monocytogenes* e *Salmonella* sp. Os resultados de coliformes, *E. coli*, *S. aureus* foram expressos como unidades formadoras de colônias por g (UFC / g), e o nível mínimo de detecção foi de 10 UFC / g.

#### **4.3.1. Enumeração de mesófilos aeróbios**

Foram pesados, assepticamente, 25 g de cada queijo, e trituradas em *stomacher* (Interscience) com 225 mL de solução citrato 1% (m/v), por 60 segundos. Foram preparadas diluições seriadas a fim de se obter enumeração entre 15 e 150 colônias por placa. Volumes de 1,0 mL de cada diluição foram inoculados em placas Petrifilm™ Rapid Aerobic Count, RAC (3M Microbiology) para mesófilos aeróbios de acordo com AOAC (2000). As placas foram incubadas a  $32\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$  por 48 horas. A leitura das placas foi realizada após 48 horas de incubação, para enumeração de mesófilos aeróbios.

#### **4.3.2. Enumeração de coliformes totais e *Escherichia coli***

Foram pesados, assepticamente, 25 g de cada queijo, e triturados em *stomacher* (Interscience, Saint Nom, França) com 225 mL de solução citrato 1% (m/v), por 60 segundos. Foram preparadas diluições seriadas a fim de se obter enumeração entre 15 e 150 colônias por placa. Volumes de 1,0 ml de cada diluição foram inoculados em placas Petrifilm™ EC Cont Colif (3M Microbiology, St. Paul, MN) para coliformes totais e *E. coli* de acordo com Wehr e Frank (2004). As placas foram incubadas a  $35\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$  por 24 - 48 horas. As leituras das placas foram realizadas após 24 e 48 horas de incubação, para enumeração de coliformes totais e *E. coli*, respectivamente.

#### **4.3.3. Enumeração de *S. aureus***

Porções de 25 g de cada queijo, pesadas assepticamente, foram trituradas em *stomacher* com 225 mL de solução citrato 1% (m/v), por 60 segundos. Foram preparadas diluições seriadas a fim de se obter enumeração entre 15 e 150 colônias por placa. Volumes de 1 ml de cada diluição foram inoculados em placas Petrifilm™ Staph Express (3M Microbiology), de acordo com AOAC (2001). As placas foram incubadas a  $35\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$  por  $24 \pm 2$  horas. Após a leitura da placa com enumeração das colônias típicas (colônias violeta), foi adicionado disco de Dnase na própria placa. A incubação com o disco de DNase variou de 1 a 3 horas, onde foi observada a formação de halo. A presença de halo foi confirmativa para *S. aureus* (capacidade de produção de termonuclease) (Vicosa et al., 2010).

#### **4.3.4. Detecção de *Listeria monocytogenes***

A presença foi detectada de acordo com a ISO 11290-1 (1996) onde porções de 25 g de cada queijo, pesadas assepticamente, foram homogeneizadas em *stomacher* (Interscience), por 60 segundos, com 225 mL de caldo Half Fraser (BD-Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes, NJ). A incubação foi por 24 horas a 30 °C. Após incubação foi transferido 0,1 mL para tubos contendo 10,0 mL de caldo Fraser (BD) incubando-se a 35 °C por 48 horas. Após a incubação, com uso de alça de platina, foram feitas estrias da cultura em duas placas de Agar Palcam e Oxford (ambas da Oxoid Ltd., Basingstoke, Inglaterra). As placas foram incubadas a 35 °C e examinadas após 24 e 48 horas para identificação de colônias típicas de *Listeria* spp.

#### **4.3.5. Detecção de *Salmonella* sp.**

Porções de 25 g de cada queijo, pesadas assepticamente, foram homogeneizadas em *stomacher* (Interscience) com 225 mL de caldo lactosado (Oxoid). A incubação foi por 24 h a 35°C. Após incubação, as amostras foram homogeneizadas e alíquotas 0,1 mL e 1,0 mL foram transferidas respectivamente, para tubos contendo 10 mL de caldo Rappaport-Vassiliadis (incubado a 42 °C por 24h) e caldo Tetrionato (incubado a 35 °C por 24h) (ambos da Oxoid). Após as 24 h, os tubos foram homogeneizados e os cultivos semeados em placas com Agar xilose lisina desoxicolato – XLD e Agar Hektoen - HE (ambos da Oxoid), em estrias de modo a obter colônias isoladas. As placas permaneceram incubadas a 35 °C por 24 h e foram examinadas cuidadosamente para identificação de colônias típicas de *Salmonella* sp. (Wehr e Frank, 2004).

### **4.4. Identificação de Pontos de Contaminação**

#### **4.4.1. Seleção dos produtores**

Os pontos de contaminação na produção foram examinados após a confirmação do isolamento de mesófilos aeróbios, coliformes totais, *E. coli* e *S. aureus* em amostras de QMA analisadas. Para avaliar os pontos de contaminação na produção, duas queijarias que produziram queijos com baixos níveis de contagens de *E. coli* foram incluídas nessa fase, constituindo o grupo controle

(inferior a 3 log UFC/g, classificados como queijarias 'controles' de *E. coli*) e duas que produziram amostras de QMA com contagens elevadas de *E. coli* (superior a 4 log UFC/g, categorizadas como *E. coli* "contaminadas"). O mesmo critério foi considerado para selecionar quatro processadores de queijo com base nas contagens de *S. aureus* em amostras de QMA (inferior a 2 log UFC/g categorizados como 'controle' de *S. aureus* e superior a 3 log UFC/g, categorizadas como *S. aureus* "contaminadas").

Nestas unidades foram feitas as identificações do ponto ou pontos de contaminação, ou seja, foi realizada investigação para determinação dos locais onde estava havendo contaminação pelo patógeno. A produção de um lote de QMA foi acompanhada e foram coletadas amostras de leite cru (n=8), soro de leite (n=8), salmoura (n=8) e QMA (n=4) das quatro queijarias selecionadas. Além disso, amostras de superfície (50 cm<sup>2</sup>) foram obtidas com swabs estéreis umedecidos com solução NaCl (0,85% p/v) (Wehr e Frank, 2004) a partir dos seguintes itens: mesas de trabalho (n=4), tanque de produção (n=4), formas de moldagem (n=4) e mãos de operários (n=4). Todas as amostras foram diluídas sucessivamente usando 0,85% NaCl (vol / vol), e plaqueadas para enumeração de *E. coli* e *S. aureus*. Também foi realizada a pesquisa de *Salmonella sp.* e *L. monocytogenes* como previamente descrito.

Os resultados foram expressos como UFC / g, mL ou cm<sup>2</sup>, conforme apropriado, e comparados com base nas diferentes etapas de produção e cargas microbianas do microrganismo alvo de queijarias "controles" e "contaminadas".

#### **4.4.2. Coleta de amostras para análises microbiológicas**

##### **4.4.2.1. Amostras líquidas e sólidas**

As amostras de leite cru, soro e salmoura foram coletadas durante a produção do queijo e acondicionadas em frascos estéreis. Uma amostra de queijo artesanal foi coletada ao final da produção (após salga e acondicionamento em embalagem) e transportada sob refrigeração até ao Laboratório. Foram feitas diluições seriadas do material e inoculadas nos meios e nas condições descritas anteriormente no item 4.3. Os resultados foram expressos como UFC/g ou UFC/mL, conforme apropriado, e comparados com base nas diferentes etapas de produção e

cargas microbianas do microrganismo alvo de queijarias "controles" e "contaminadas".

#### **4.4.2.2. “Swab” de equipamentos**

Um molde de 50 cm<sup>2</sup> foi colocado sobre a superfície analisada logo após a etapa de higienização e o “swab” umedecido em solução diluente (solução de NaCl 0,85% (p/v)) foi aplicado com pressão constante, em movimentos giratórios, numa inclinação de 30°, descrevendo movimentos de baixo para cima e da esquerda para direita. A parte manuseada do swab foi descartada e o restante acondicionado no tubo contendo a solução diluente. Os tubos foram acondicionados em caixa de isopor com gelo e encaminhados ao laboratório. Foram feitas diluições seriadas do material e inoculadas nos meios e nas condições descritas anteriormente no item 4.3. Os resultados foram expressos em UFC/cm<sup>2</sup>.

#### **4.4.2.3. “Swab” de mãos de colaboradores**

“Swab” esterilizado e umedecido em solução diluente (solução de NaCl 0,85% (p/v)) foi friccionado na superfície da palma e borda das mãos, logo após a higienização das mesmas, partindo da região do punho e passando depois entre os dedos. A parte manuseada do “swab” foi descartada e o restante acondicionado no tubo contendo a solução diluente. Os tubos foram acondicionados em caixa de isopor com gelo e encaminhados ao laboratório. Foram feitas diluições seriadas do material e inoculadas nos meios e nas condições descritas anteriormente no item 4.3.

### **4.5 Avaliação dos queijos Minas artesanal das Entre Serras durante o período de maturação**

#### **4.5.1. Definição e coleta das amostras**

As amostras de queijos Minas artesanais Entre Serras foram escolhidas conforme explicado no item 4.4.1, de quatro unidades produtoras durante o processo de maturação desses queijos no período de março a junho de 2019. Um total de 28 amostras foram coletadas (Tabela, 3).



**Tabela 3** - Características das queijarias incluídas na avaliação dos queijos durante a maturação.

Queijaria	Altitude	Município	ISF <sup>1</sup>	LLPD <sup>2</sup>	Uso do “pingo”	MTM <sup>3</sup>	TBPF <sup>4</sup>
A	732 m	Santa Bárbara	Sim	100	Sim	Sim	Sim
B	732 m	Santa Bárbara	Não	100	Sim	Sim	Não
C	791 m	Barão de Cocais	Sim	80	Sim	Sim	Sim
D	732 m	Santa Bárbara	Não	60	Sim	Sim	Não

<sup>1</sup>Inscrição no serviço de fiscalização; <sup>2</sup>Litros de leite processado por dia; <sup>3</sup> Maturação em tábuas de madeira; <sup>4</sup>Treinamento em boas práticas de fabricação.

Durante a maturação, sete amostras de cada produtor (de um lote único) foram armazenadas sob condições ambientes, os queijos foram armazenados sem embalagem em uma temperatura ambiente e umidade relativa (UR) em torno de 80% em seu próprio local de maturação nas propriedades, em prateleiras de madeira. As amostras de queijos foram coletadas após a fabricação (tempo 0 dias) e foram analisados nos tempos 0, 7, 15, 21, 30, 45 e 60 dias de maturação. As amostras foram então transportadas em cada tempo pré-determinado (0, 7, 15, 21, 30, 45, 60 dias de maturação) para Laboratório Inovaleite do Departamento de Tecnologia de Alimentos da Universidade Federal de Viçosa para serem analisadas quanto às características físicas, físico-químicas e microbiológicas.

#### 4.5.2 Análises microbiológicas

As amostras de queijos Minas Artesanais foram submetidas à metodologia de enumeração de mesófilos aeróbios, coliformes totais, *E. coli*, *S. aureus*, e detecção de *L. monocytogenes* e *Salmonella sp.* conforme item 4.3. Os resultados de coliformes, *E. Coli*, *S. aureus* foram expressos como unidades formadoras de colônias por g (UFC / g), e o nível mínimo de detecção foi de 10 UFC / g.

#### 4.6. Biodiversidade de bactérias lácticas dos queijos Minas Artesanais

##### 4.6.1. Isolamento de bactérias lácticas de queijos Minas Artesanais

Porções de 25 g de cada amostra de queijo Minas artesanal foram diluídas

em 225 mL de solução citrato 2% (m/v). Em seguida, foram realizadas diluições seriadas. Foi realizado plaqueamento por profundidade com os meios de cultura ágar Man-Rogosa and Sharpe - MRS (Kasvi, Curitiba, Paraná, Brasil), ágar M17 (Himedia, Mumbai, Índia) e ágar Mayeux, Sandine e Elliker - MSE (Biokar Diagnostic, Beavais, França) (Mayeux et al., 1962). As placas contendo o meio de cultura MRS foram incubadas a 37°C e 30° C por 48 horas em aerobiose e anaerobiose, M17 a 35 °C por 48 horas em aerobiose e MSE a 22 °C por 96 horas em aerobiose e anaerobiose.

A enumeração foi realizada após a incubação, sendo consideradas placas contendo de 25 a 250 UFC/mL. Foram isoladas 1300 colônias provenientes das 28 amostras. A partir de colônias com diferentes morfotipos, cores e tamanhos foram feitas duas estrias em placas contendo ágar MRS (Kasvi), M17 (Himedia) e MSE (Biokar Diagnostics) a fim de obter a purificação dessas colônias. As 1300 colônias foram inoculadas nos meios de cultura iniciais em tubos de ensaio contendo 5 mL de caldo correspondente ao meio em que foram isolados (M17, MRS e MSE Kasvi, Himedia, Biokar Diagnostics respectivamente). Em seguida, os tubos foram incubados nas suas respectivas temperaturas e tempos descritos anteriormente, período em que foi observado o desenvolvimento de turbidez no caldo. Decorrido esse período os isolados purificados foram armazenados a -80 °C em caldo (MRS, M17 ou MSE) suplementado com 30% (v/v) de glicerol para posterior caracterização. Devido a pandemia de COVID-19 a caracterização desses isolados ficaram para futuros trabalhos.

#### **4.6.2. Identificação das bactérias lácticas isoladas de queijo Minas artesanal por técnicas de biologia molecular**

##### **4.6.2.1. Extração e sequenciamento do DNA total obtido dos queijos**

Amostras de aproximadamente 25 g de cada queijo foram obtidas a partir do núcleo e da casca dos queijos em condições estéreis, foram transferidos para sacos estéreis e transportadas em gelo seco para Neopropecta Microbiome Technologies (Florianópolis, SC, Brasil) para extração de DNA, preparação de biblioteca e sequenciamento do DNA.

O DNA foi extraído usando esferas magnéticas, com base em protocolo de extração padrão de propriedade da Neopropecta (Christoff et al., 2017). O DNA foi

então quantificado usando Qubit (ThermoFisher, Waltham, MA, EUA). As regiões V3-V4 do 16S rRNA foram amplificadas usando os primers 341F-806R (Caporaso et al., 2011; Wang & Qian, 2009), resultando em produtos de PCR com um tamanho aproximado de tamanho 465 bp. Amplificação por PCR e sequenciamento foram realizados conforme descrito anteriormente (Christoff et al., 2017; Rampelotto et al., 2019).

#### **4.6.2.2. Análise de dados**

Os dados brutos do MiSeq foram processados usando um pipeline de propriedade de Neoprosecta (Christoff et al., 2017). As leituras foram submetidas individualmente ao controle de qualidade com base na soma das probabilidades de erro de suas bases, permitindo no máximo 1% de erro acumulado. As sequências de DNA correspondentes aos adaptadores de tecnologia Illumina foram removidos e as sequências que passaram nos procedimentos iniciais e tiveram 100% de identidade foram agrupadas em filotipos/clusters e definidas como uma unidade de taxonomia operacional (OTU). As OTU identificadas foram alinhadas por comparação usando um banco de dados de sequência precisa 16S rRNA (NeoRef, Neoprosecta) definido em um nível de identidade de 99% (Christoff et al., 2017), usando BLAST (Camacho et al., 2009). Para todas as análises baseadas em OTU, exceto para rede de co-ocorrência, a tabela OTU original foi normalizada usando o método de escala de soma cumulativa (ESC) (Paulson et al., 2013).

#### **4.6.2.3. Tratamentos estatísticos**

Os valores normalizados de OTU foram plotados em uma tabela usando as frequências registradas e agrupados de acordo com a identificação de gênero e espécie. Os dados foram analisados usando o módulo *Marker Data Profiling* do *MicrobiomeAnalyst* (Chong et al., 2020; Dhariwal et al., 2017). As frequências foram filtradas de acordo com as frequências (registro único) e a faixa interquartil e padronizadas usando o *total sum scaling* (TSS) (Kim et al., 2017). A diversidade alfa foi medida por amostra usando o método de riqueza Chao1, onde os grupos são baseados em gêneros / espécies identificados e comparados com um teste ANOVA ( $p < 0,05$ ). As métricas de diversidade beta (índice de Bray-Curtis) e a Análise de Coordenadas por Princípios (PCoA) foram realizadas usando o PERMANOVA. A análise do microbioma foi realizada com base em gêneros e espécies identificados,

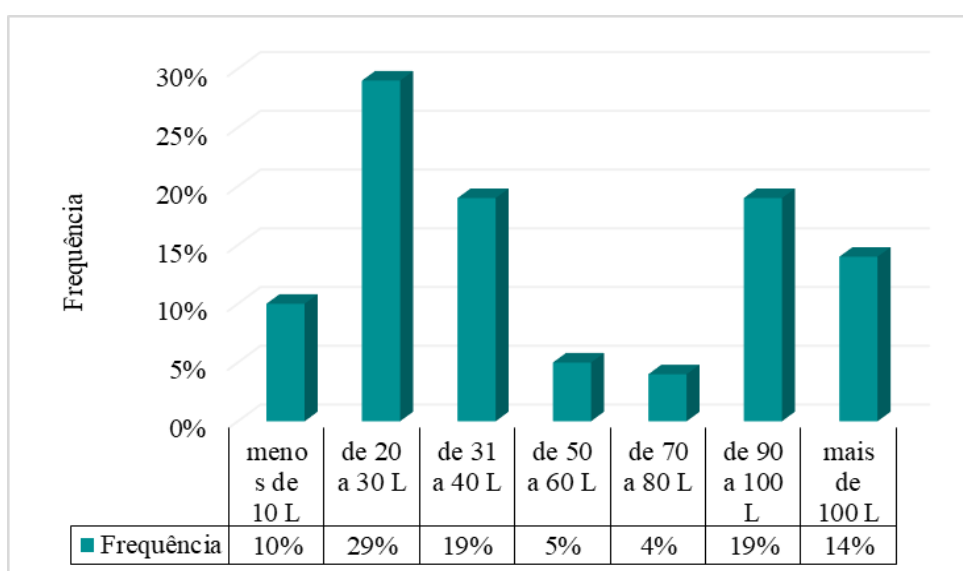
com uma prevalência mínima de amostra de 10%.

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 Diagnóstico

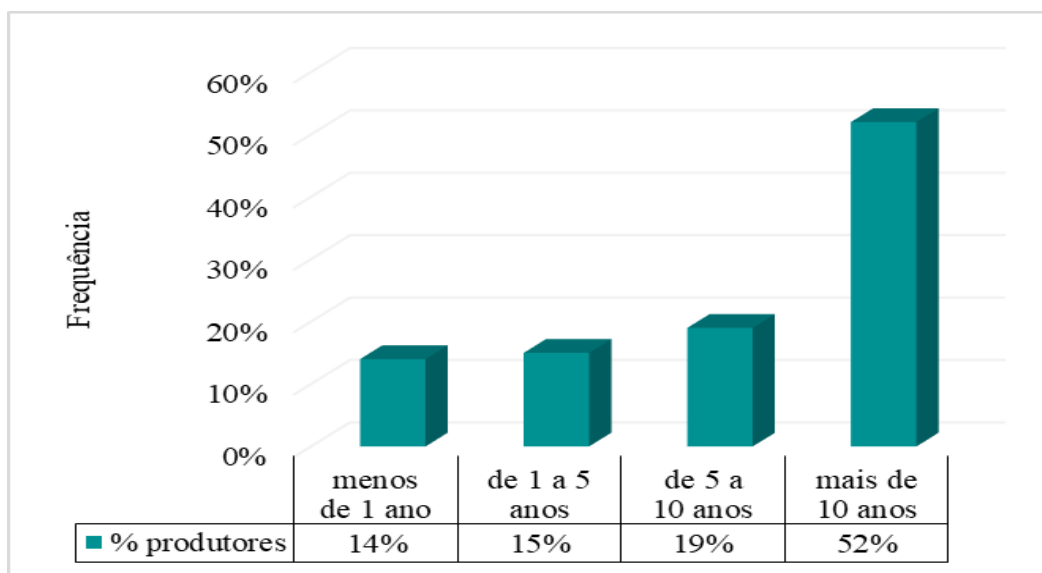
O diagnóstico permitiu o conhecimento da cadeia produtiva do QMA Entre Serras, e também dos fatores humanos e tecnológicos envolvidos no processo. O trabalho de pesquisa de campo desenvolvido junto aos produtores de queijo na microrregião, levantou dados referentes às características gerais, gerenciais e tecnológicas. A pesquisa mostrou dados importantes que podem ajudar nas tomadas de decisões quanto aos investimentos pelos produtores rurais, ou mesmo na elaboração de projetos para o apoiar os fabricantes de queijos na obtenção do reconhecimento da região como produtora de QMA.

O estudo mostra como ocorre a produção de leite na microrregião pesquisada. Foi analisada a produção de leite diária (L dia) (Figura 3). Ao se analisar a Figura 3, verifica-se a predominância de pequenos produtores na região pesquisada, com uma produção de leite média diária de até 100 L dia. A maioria dos produtores avaliados são caracterizados por propriedades pequenas de 20 a 30 litros que necessitam de aumentar a lucratividade da propriedade com produtos de valor agregado como o queijo.



**Figura 3** - Produção diária de leite (L) nas propriedades rurais da região das Entre Serras.

O tempo de experiência dos produtores pesquisados na produção de QMA, encontra-se ilustrado na Figura 4. Verificou-se que 52% dos produtores estão na atividade há mais de 10 anos. Ao mesmo tempo, detectou-se que novos produtores (14%) estão iniciando na atividade com menos de 1 ano de experiência, além de outros que estão na atividade de 1 a 5 anos (15%) e de 5 a 10 anos (19%). Essas informações nos mostram que a produção de QMA na região das Entre Serras é uma atividade tradicional, onde os saberes adquiridos são transmitidos para as novas gerações, porém existe uma porcentagem utilizando de métodos de fabricação diferentes. Essa transmissão de conhecimento pode ser comprovada pela permanência da atividade em sua forma tradicional. Por outro lado, foi observado que existem métodos produtivos diferentes, existem produtores que estavam elaborando queijo frescal de leite cru e não QMA, fazendo se necessário consolidar os métodos de fabricação tradicionais. Por isso, há necessidade de um treinamento em boas práticas de fabricação para melhorar a qualidade do QMA sem, no entanto, modificar o processo de fabricação do mesmo, já que este processo é um fator caracterizador do produto.



**Figura 4** - Tempo de experiência dos produtores na fabricação do queijo Minas artesanal na região das Entre Serras.

Apenas 20% dos entrevistados relataram já ter participado de algum programa de capacitação de obtenção de leite de qualidade, produção de queijos, produção de derivados de leite ou produção de QMA. Este resultado pode indicar a

baixa capacitação da mão de obra empregada na atividade, refletindo na qualidade do QMA. A capacitação dos produtores se faz necessária para tentar corrigir as falhas que se verificam nos sistemas de produção, em virtude de práticas inadequadas.

O questionário aplicado aos produtores permitiu a caracterização das diversas etapas do processamento do QMA da região das Entre Serras e possibilitou registrar algumas de suas peculiaridades. O processo de fabricação é um dos fatores mais importantes que define as características do produto.

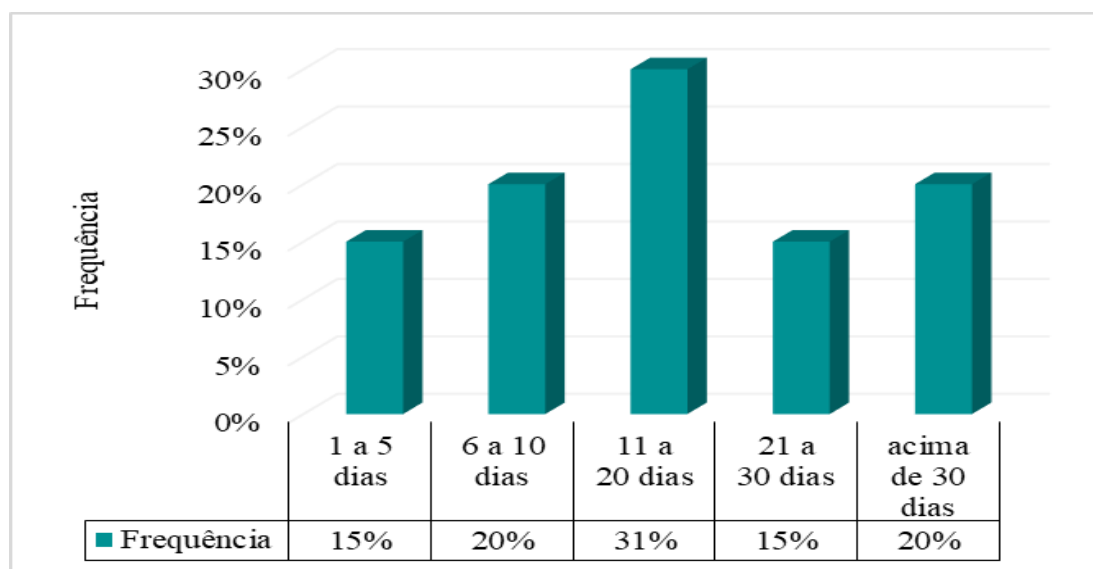
No caso da região pesquisada, caracterizada por pequenos produtores, a procedência da matéria-prima vincula-se, diretamente, a quem produz o queijo artesanal. O produtor de leite também é produtor de QMA (91%) e 9% compram todo o leite de terceiros. Esses, mesmo tendo uma pequena produção, não se enquadravam como produtores queijos artesanais pois é vedado pela legislação nº 23157 de 2018 a compra de leite para a produção dos mesmos.

Os queijos de todos os produtores são fabricados a partir de leite cru integral, e durante a pesquisa, foi identificada que 100% dos produtores de queijos realizavam a filtração. O objetivo primário de se filtrar o leite cru é remover sujidades e contaminantes como palhas, folhas, cabelo, sementes, solo e parasitas, com a finalidade de garantir um produto de melhor qualidade, com a ausência de perigos físicos.

A maturação dos queijos corresponde à fase de transformações físicas, químicas e microbiológicas, que 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, pois varia de queijo para queijo (Perry, 2004). Durante a pesquisa pode ser observado diferentes tempos utilizados pelos produtores para a maturação dos seus queijos, demonstrando uma falta de padronização para esse quesito como ilustrado na Figura 5.

A coagulação do leite é feita em tambores plásticos por 100% dos produtores. O produtor faz uso do tambor plástico por ser de uso comum pela maioria dos produtores e principalmente por ter um custo relativamente baixo. A acidificação do leite ocorre geralmente através da produção de ácido láctico, como resultado da fermentação da lactose por BAL. A velocidade e a extensão da acidificação são dependentes de alguns parâmetros (variação da microbiota presente e temperatura ambiente, dentre outros), resultando em queijos de

qualidade variável (Fox et al., 2000). Uma das características marcantes desse queijo é o emprego na sua fabricação de um fermento natural, usado pelos queijeiros da região, denominado “pingo”, 52% dos produtores pesquisados fazem uso desse fermento endógeno.



**Figura 5** - Tempo de maturação do queijo Minas artesanal utilizado pelos produtores da região das Entre Serras

Um ponto positivo observado nos resultados da pesquisa de campo refere-se ao fato da maioria dos produtores apresentar alternativas para o aproveitamento do soro produzido nas queijarias. No caso dos produtores de queijos pesquisados, 95% coletam o soro. Do total recolhido, 100% têm como destino a alimentação animal (criações próprias).

O diagnóstico realizado sobre os queijos artesanais da região das Entre Serras sugere a importância de trabalhos mais aprofundados nessa região, para adequação de infra-estrutura, sanidade do rebanho e BPF, para que os queijos sejam produzidos com segurança. A padronização do seu processo de fabricação, bem como a definição do seu período de maturação, poderá gerar dados que fundamentem a sua certificação de origem, valorizando-o como um produto tradicional, seguro e de qualidade, imprescindível para garantir a sustentabilidade dos produtores dedicados a esta atividade.



## 5.2 Análises microbiológicas do queijo Minas artesanal das Entre Serras

Após o diagnóstico realizado através da aplicação de questionário aos produtores, foram selecionadas 14 queijarias para uma amostragem dos queijos produzidos. Esses queijos foram adquiridos de acordo com o período de maturação em que eram comercializados por cada queijaria. Para avaliar a qualidade e a inocuidade microbiológica dos queijos foram realizadas contagens de mesófilos aeróbios, coliformes totais, *E. coli* e *S. aureus* e a detecção de *Salmonella* sp. e *L. monocytogenes*, os resultados obtidos estão indicados na tabela 4.

**Tabela 4** - Contagem de mesófilos aeróbios, coliformes totais, *E. coli* e *S. aureus* e detecção de *Salmonella* sp. e *L. monocytogenes* em amostras de queijo Minas artesanal fabricados na região das Entre Serras, MG.

Amostras	Mesofilos	Coliformes			<i>Salmonella</i>	<i>Listeria.</i>
	Aeróbios (Log UFC/g)	totais (Log UFC/g)	<i>E. coli</i> (Log UFC/g)	<i>S.aureus</i> (Log UFC/g)		<i>monocytogenes</i>
1	7,83	7,04	6,00	5,20	Ausência	Ausência
2	6,65	2,00	2,00	2,00	Ausência	Ausência
3	7,41	4,67	2,60	4,04	Ausência	Ausência
4	5,90	2,85	2,85	4,20	Ausência	Ausência
5	8,11	2,70	2,70	5,38	Ausência	Ausência
6	7,48	6,18	5,18	5,04	Ausência	Ausência
7	8,76	8,18	5,00	5,38	Ausência	Ausência
8	8,08	5,18	6,18	6,26	Ausência	Ausência
9	6,87	5,08	3,30	2,95	Ausência	Ausência
10	8,15	4,08	4,04	2,00	Ausência	Ausência
11	8,30	4,34	5,04	3,20	Ausência	Ausência
12	8,20	3,64	4,64	4,00	Ausência	Ausência
13	9,34	6,86	7,28	4,95	Ausência	Ausência
14	8,04	3,64	3,60	2,00	Ausência	Ausência

A média das contagens de mesófilos aeróbios estritos e facultativos viáveis do QMA das Entre Serras foi de 7,79 log de UFC/g. Essas contagens elevadas podem estar relacionadas com as altas contagens de BAL também observadas, interferido assim nas contagens totais de mesófilos. Porém, normalmente a contagem de mesófilos em produtos fermentados, como é o caso de queijos maturados, apresenta populações naturalmente altas, o que não está relacionado diretamente com baixa qualidade do produto (Silva; Junqueira; Silveira, 2010).

A contagem média para coliformes foi de 4,74 log UFC/g estando 64,28% das amostras com valores superiores aos valores de referência, conforme definido pela legislação (Minas Gerais, 2008). Uma análise geral dos dados obtidos demonstra altas contagens de microrganismos indicadores de más condições de higiene nas amostras de QMA, indicando falhas no controle de qualidade adotados pelas queijarias estudadas. A presença de contagens elevadas de coliformes também foi observada por outros autores em QMA produzidos (Ferreira, Spini, Carrazza et al., 2011; Oliveira, 2014). *E. coli* foi identificada em 57,14% das amostras de QMA acima dos valores de referência com uma média de contagem de 4,31 log UFC/g. A presença de alta contagem de *E. coli* em QMA indica más condições higiênicas sanitárias durante o processamento, esses resultados demonstram que os riscos potenciais para os consumidores devem ser avaliados após a identificação do potencial patogênico de isolados específicos (Gonzalez et al., 2000). Os resultados obtidos no presente estudo são similares aos observados por outros autores que verificaram contagens elevadas para esse microrganismo em queijos artesanais (Dores, Nobrega & Ferreira, 2013; Oliveira, 2014; Martins et al., 2015)

*S. aureus* foi detectado em 71,43% das amostras QMA acima dos valores de referência, estando em desacordo com os parâmetros de comparação estabelecidos pela legislação brasileira para estafilococos coagulase positivos (Minas Gerais, 2008) sugerindo condições sanitárias inadequadas durante a produção. A contaminação por *S. aureus* em QMA ocorre principalmente através do leite de qualidade insatisfatória, pelo manipulador portador assintomático e pelo ambiente e utensílios mal higienizados (Borges et al., 2008). Apesar da implementação das ferramentas de controle de contaminantes como BPF e boas práticas agropecuárias serem obrigatórias nas indústrias alimentícias brasileiras, os dados obtidos destacam que um rigoroso controle higiênico de qualidade deve começar no início

da produção leiteira. Muitos estudos com QMA demonstram a presença de *S. aureus*, indicando a relevância desse microrganismo indicador veiculado por alimentos (Guedes Neto, 2008; Resende, 2010). Mesmo tendo a presença de uma contagem superior à legislação brasileira atual os queijos têm aceitação no mercado e não apresentam estufamento precoce, indicando que o equilíbrio da microbiota pode estar controlando a multiplicação dos microrganismos indicadores.

As legislações estaduais (Minas Gerais, 2008) e federais referentes aos queijos Minas artesanais, exigem a ausência de *Listeria sp* e *Salmonella sp* em 25g de amostra de queijo. De acordo com os resultados obtidos, todas as amostras de queijo analisadas apresentaram ausência de *L. monocytogenes* e *Salmonella sp.*, como observado em estudos semelhante com queijos artesanais (Resende, 2010; Dores, Nobrega & Ferreira, 2013).

### 5.3 Identificação de Pontos de Contaminação

Baseado nos dados obtidos foi feita uma classificação das queijarias e baseada nessa classificação uma nova amostragem foi realizada. A partir desses resultados, após a confirmação do isolamento de *E. coli* e *S. aureus* em amostras de QMA analisadas, quatro queijarias foram selecionadas para avaliação dos pontos de contaminação na produção. A Tabela 3 mostra os resultados das pesquisas de *E. coli*, *S. aureus*, mesófilos aeróbios e coliformes totais em várias etapas da produção de QMA nas queijarias selecionadas, classificados como "contaminadas" e "controles" com base nos dados anteriores. Todos os microrganismos analisados estão presentes no leite cru utilizado por todas as queijarias selecionadas, sugerindo que matéria prima pode ser considerada a principal fonte desses microrganismos nos produtos finais (Tabela 5). Isto é demonstrado pelas contagens de *E. coli*, *S. aureus*, mesófilos aeróbios e coliformes totais no soro. Esses resultados ao longo da cadeia produtiva indicam a presença desses microrganismos, o que torna possível a contaminação contínua durante toda a produção de queijo.

Como observado, a contaminação por *S. aureus* de queijarias "contaminadas" e "controles" apresentaram maiores contagens quando comparado a contaminação por *E. coli* (Tabela 5). As contagens elevadas de *S. aureus* podem indicar a presença de mastite bovina no rebanho leiteiro, porém fatores como obtenção inadequada de leite e hábitos higiênicos insatisfatórios podem contribuir

para o aumento da contaminação desse microrganismo em queijos artesanais (Borges et al., 2008). Senger e Bizani (2011) analisando queijo Minas artesanal da cidade de Canoas/RS também identificaram níveis de *S. aureus* superiores aos valores máximos aceitáveis. Estes resultados destacam a necessidade de maior cuidado e BPF para a produção desses queijos.

**Tabela 5** - Valores médios das contagens de *E. coli*, *S. aureus*, mesófilos aeróbios e coliformes totais das diferentes etapas da produção de queijo Minas artesanal Entre Serras.

Etapas de Produção QMA	Unidade	<i>E. coli</i> <sup>a</sup>		<i>S. aureus</i> <sup>b</sup>		Mesófilos aeróbios		Coliformes Totais	
		Queijarias	Queijarias	Queijarias	Queijarias	Queijarias	Queijarias	Queijarias	Queijarias
		Contaminadas	Controle	Contaminadas	Controle	Contaminadas	Controle	Contaminadas	Controle
Leite Cru	Log UFC/mL	3,54	2,00	3,86	3,39	6,61	5,36	5,54	4,36
Soro	Log UFC/mL	3,61	2,30	4,12	2,00	6,67	5,72	5,38	4,91
Forma	Log UFC/cm <sup>2</sup>	1,85	1,39	2,84	1,54	4,33	3,00	3,61	2,65
Tanque	Log UFC/cm <sup>2</sup>	2,54	1,00	2,54	1,45	4,25	3,93	3,91	3,30
Mãos	Log UFC/cm <sup>2</sup>	<1,00	<1,00	<1,00	<1,00	1,74	<1,00	<1,00	<1,00
colaboradores									
Mesa	Log UFC/cm <sup>2</sup>	2,00	1,00	2,27	1,39	3,00	2,65	2,24	1,30
Queijos	Log UFC/g	5,73	4,79	5,15	4,84	8,26	8,16	7,34	6,44

<sup>a</sup> As contagens de *E. coli* registradas durante a produção de duas queijarias classificadas como "contaminadas" (amostras que na primeira parte da pesquisa obtiveram contagens superiores a 4 log UFC/g) e duas queijarias classificados como "controles" (amostras que na primeira parte da pesquisa obtiveram contagens inferiores a 3 log UFC/g).

<sup>b</sup> As contagens de *S. aureus* registradas durante a produção de duas queijarias classificadas como "contaminadas" (amostras que na primeira parte da pesquisa obtiveram com contagens superiores a 3 log UFC/g) e duas queijarias classificados como "controles" (amostras que na primeira parte da pesquisa obtiveram contagens inferiores a 2 log UFC/g)

Foram encontradas altas contagens de coliformes totais nas queijarias controles e contaminadas no leite, soro, forma, tanque e queijo (tabela 5). Os coliformes podem causar alterações indesejáveis no queijo, como o estufamento precoce, devido a produção de gases após a fermentação da lactose (Sobral et al., 2017). *Enterobacter*, *Escherichia*, *Klebsiella* e *Citrobacter* são gêneros de coliformes que indicam má higienização dos utensílios utilizados, água contaminada, falta de higienização dos manipuladores. Entre os coliformes termotolerantes, destaca-se a *E. coli*, bactéria presente no trato intestinal humano e também de animais. A presença da *E. coli* caracteriza contaminação fecal, mesmo que essa espécie seja capaz de formar biofilme nos utensílios utilizados na produção dos alimentos (Okura, 2010).

As queijarias classificadas como "contaminadas" apresentaram níveis detectáveis de *E. coli* e *S. aureus* em soro de leite, formas de moldagem, tanque e mesa de produção e produtos finais (Tabela 5). Esses resultados indicam o impacto do processamento e a manipulação inadequada que leva à contaminação por esses microrganismos em queijarias (Kousta et al., 2010). A relevância do ambiente de processamento na contaminação de patógenos veiculados por alimentos é amplamente descrita em vários estudos (Sales, 2015; Nasser et al., 2015; Pontarolo et al., 2017). Portanto, é necessária a adoção obrigatória de procedimentos higiênicos e protocolos de controle padronizados além de uma condição de maturação ideal para obter produtos finais com níveis adequados de segurança e qualidade, evitando assim a contaminação dos queijos durante o processamento.

Não existem padrões para contagens de mesófilos estritos e facultativos viáveis em queijos artesanais, porém a contagem de mesófilos aeróbios é o método mais utilizado como indicador geral de populações bacterianas em alimentos, a fim de se obter informações gerais sobre a qualidade de produtos, matérias primas utilizadas, condições de processamento, manipulação e vida de prateleira (Ferraz, 2016). Contagens elevadas de mesófilos em alimentos podem indicar que os mesmos, foram elaborados com matérias-primas altamente contaminadas ou que o processamento foi insatisfatório do ponto de vista sanitário (Pereira, 2007; Reis; Hoffmann; Hoffmann, 2006; Leite Junior et al., 2000). No entanto, não é um indicador de inocuidade, pois não está diretamente ligado à presença de patógenos ou toxinas (Silva; Junqueira; Silveira, 2010). Pode estar relacionada com uma contaminação benéfica que vai ajudar e no controle microbiológico dos

microrganismos indicadores.

Não foi detectada a presença de *Salmonella* sp. e *L. monocytogenes* em nenhuma etapa de produção, a ausência nas etapas de fabricação do QMA vai ao encontro dos resultados microbiológicos dos queijos analisados anteriormente, em que também não houve detecção desses microrganismos.

#### **5.4 Características microbiológicas do queijo Entre Serras durante a maturação**

As contagens de mesófilos aeróbios, coliformes totais, *E. coli*, *S. aureus*, e a presença de *Salmonella* sp. e *L. monocytogenes* foram monitorados durante 60 dias de maturação. O estudo realizado durante a maturação foi de grande importância para observar o comportamento dos indicadores de higiene e inocuidade durante esse período. Esses resultados indicam que a maturação tem influência nas características do produto analisado. As contagens dos microrganismos indicadores obtidos das queijarias A, B, C e D podem ser visualizadas nas tabelas 6,7,8 e 9. Os círculos das tabelas 6, 7, 8 e 9 representam o momento em que cada indicador analisado atingiu o critério microbiológico mínimo requerido pela legislação brasileira atual (Minas Gerais, 2008).

**Tabela 6** - Contagem de coliformes totais, *E. coli*, *S. aureus*, mesófilos aeróbios em log UFC/g e detecção de *Salmonella* sp e *L. monocytogenes* durante a maturação no produtor A.

Tempo (Dias)	Mesófilos aeróbios (Log UFC/g)	Coliformes totais (Log UFC/g)			<i>Salmonella</i> sp.	<i>L. monocytogenes</i>
			<i>E. coli</i> (Log UFC/g)	<i>S. aureus</i> (Log UFC/g)		
0	8,40	7,89	5,58	6,28	Ausência	Ausência
7	8,45	5,88	4,00	4,00	Ausência	Ausência
15	8,11	5,41	4,00	4,00	Ausência	Ausência
21	7,61	4,00	3,00	4,00	Ausência	Ausência
30	5,26	2,95	1,00	1,00	Ausência	Ausência
45	4,67	2,04	1,00	1,00	Ausência	Ausência
60	4,00	2,48	1,00	1,00	Ausência	Ausência

**Tabela 7** - Contagem de coliformes totais, *E. coli*, *S. aureus*, mesófilos aeróbios em log UFC/g e detecção de *Salmonella* sp e *L. monocytogenes* durante a maturação no produtor B.

Tempo (Dias)	Mesófilos aeróbios	Coliformes totais			<i>Salmonella</i> sp.	<i>L. monocytogenes</i>
			<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>		
0	8,11	6,77	6,61	6,30	Ausência	Ausência
7	7,90	6,66	5,32	5,90	Ausência	Ausência
15	7,72	5,53	4,00	4,95	Ausência	Ausência
21	6,79	5,34	4,00	4,85	Ausência	Ausência
30	5,46	4,95	1,00	4,04	Ausência	Ausência
45	5,11	4,53	1,00	3,95	Ausência	Ausência
60	5,36	3,30	1,00	2,00	Ausência	Ausência



**Tabela 8** - Contagem de coliformes totais, *E. coli*, *S. aureus*, mesófilos aeróbios em log UFC/g e detecção de *Salmonella* sp e *L. monocytogenes* durante a maturação no produtor C.

Tempo (Dias)	Mesófilos aeróbios (Log UFC/g)	Coliformes totais (Log UFC/g)	<i>E. coli</i> (Log UFC/g)	<i>S. aureus</i> (Log UFC/g)	<i>Salmonella</i> sp.	<i>L. monocytogenes</i>
0	7,93	6,79	4,00	5,69	Ausência	Ausência
7	7,62	4,49	4,00	4,00	Ausência	Ausência
15	5,38	4,00	2,88	2,88	Ausência	Ausência
21	5,32	3,93	2,64	2,54	Ausência	Ausência
30	5,08	3,51	1,00	2,30	Ausência	Ausência
45	4,38	2,00	1,00	2,18	Ausência	Ausência
60	4,08	2,00	1,00	1,00	Ausência	Ausência

**Tabela 9** - Contagem de coliformes totais, *E. coli*, *S. aureus*, mesófilos aeróbios em log UFC/g e detecção de *Salmonella* sp e *L. monocytogenes* durante a maturação

Tempo (Dias)	Mesófilos aeróbios (Log UFC/g)	Coliformes totais (Log UFC/g)	<i>E. coli</i> (Log UFC/g)	<i>S. aureus</i> (Log UFC/g)	<i>Salmonella</i> sp.	<i>L. monocytogenes</i>
0	8,41	6,11	4,85	4,00	Ausência	Ausência
7	8,18	5,15	4,00	4,00	Ausência	Ausência
15	7,15	5,00	4,00	4,00	Ausência	Ausência
21	6,26	4,60	4,00	4,00	Ausência	Ausência
30	5,49	4,26	1,00	1,00	Ausência	Ausência
45	5,41	4,04	1,00	1,00	Ausência	Ausência
60	5,04	3,00	1,00	1,00	Ausência	Ausência

No começo da maturação dos queijos, as contagens de todos os microrganismos se encontravam muito elevadas. Contribuíram para a alta contagem inicial a baixa qualidade microbiológica do leite utilizado na fabricação dos queijos, possíveis contaminações geradas pelos manipuladores e as características intrínsecas dos queijos, como o elevado conteúdo de umidade e disponibilidade de substrato (açúcares), favorecendo a multiplicação bacteriana.

Uma vez que o leite não recebe nenhum tratamento para a eliminação de microrganismos contaminantes, práticas adequadas de higiene devem ser adotadas como forma de diminuir a contagem inicial de contaminantes. O pingão, sendo originado de um soro contaminado, dará sequência a um processo de recontaminação da produção, já que o mesmo será utilizado na fabricação dos queijos do dia seguinte. Além disso, o uso de equipamentos e utensílios de materiais propícios à contaminação e de difícil higienização, como a madeira, pode viabilizar a formação de biofilmes, responsáveis por uma possível contaminação dos queijos. Essa contaminação pode ser benéfica, levando ao biocontrole do produto final quando for composta por BAL, NSLAB ou outras espécies ou grupos benéficos.

As amostras do produtor A alcançaram o limite aceitável de coliformes totais, *S. aureus* e *E. Coli* para o queijo com 30 dias de maturação. Além disso, entre o período de 0 dias até os 60 dias de maturação, houve a redução de 7,8 para 2,4 log UFC/g (5,4 log de redução) de coliformes totais, de 6,2 para 1,0 UFC/g (5,2 log de redução) de *S. aureus*, e de 5,58 para 1,0 log UFC/g (4,5 log de redução) de *E. Coli* (Tabela 6). As amostras do produtor B alcançaram os critérios microbiológicos aceitáveis pela legislação para coliformes totais para o queijo com 60 dias; já os limites de *E. coli* foi atingido com 30 dias de maturação e *S. aureus* com 60 dias. Pode-se observar na Tabela 7 que das 24 horas de produção até os 60 dias de maturação houve um decréscimo de 6,7 para 3,3 log de UFC/g (3,4 log de redução) de coliformes totais; 6,6 a 1,0 log de UFC/g (5,6 log de redução) de *E. coli* e 6,3 para 2,0 log de UFC/g (4,3 log de redução) de *S. aureus*.

As amostras do produtor C alcançaram os limites aceitáveis para coliformes totais para o queijo com 30 dias; já os limites de *E. coli* foi atingido com 21 dias de maturação e *S. aureus* com 15 dias (Tabela 8). Além disso, entre o período de 0 dias até os 60 dias de maturação, houve a redução de 4,0 para 1,0 log UFC/g (3,0 log de redução) de *E. Coli*, de 6,7 para 2,0 UFC/g (4,0 log de redução) de coliformes totais, e de 5,69 para 1,0 log UFC/g (4,0 log de redução) de *S. aureus* (Tabela 8). Já as

amostras do produtor D alcançaram o limite de *S. aureus* e *E. coli* com 30 dias, coliformes totais com 60 dias de maturação. Tanto as contagens de coliformes, *E. coli* como *S. aureus* tiveram redução de 3 log das contagens das 24 horas até o final da maturação (Tabela 9).

Dores, Nobrega & Ferreira (2013) observaram decréscimos das contagens de *E. coli*, coliformes totais e *S. aureus* em estudo realizado durante a maturação de 16 amostras de queijo da Canastra maturados a temperatura ambiente. O limite aceitável de coliformes totais foi atingido com 16 dias no período das chuvas e 21 dias no período da seca; o de *E. coli* com 22 dias no período das chuvas e 18 no período da seca e o de *S. aureus* com 22 dias no período das chuvas e 21 dias no período da seca. Martins et al. (2015) concluíram que o período de maturação do queijo do Serro (provenientes de produtores que possuíam níveis diferentes de cumprimento das BPF) maturados a temperatura ambiente também teve um efeito linear negativo significativo nas contagens de coliformes, *E. coli* e *S. aureus*, mostrando que a maturação auxilia no controle desses microrganismos indesejáveis.

Até 21 dias de maturação, todas as amostras de queijo Entre Serras apresentaram contagem de coliformes totais, *E. coli* e *S. aureus* superiores às estabelecidas pela legislação brasileira. A contagem inicial de contaminantes foi alta no início da maturação. Alguns fatores contribuíram para a alta contagem inicial, entre eles a baixa qualidade microbiológica do leite a possível contaminação causada pelos manipuladores e as características intrínsecas dos queijos, como o alto teor de umidade e disponibilidade de substrato, favorecendo a multiplicação microbiana. Como o leite não é tratado para remover microrganismos contaminantes, devem ser adotadas práticas adequadas de higiene para reduzir sua contagem inicial. Outras fontes de contaminação que também podem ser mencionadas são a baixa qualidade da água usada durante a produção e práticas inadequadas de fabricação pelos manipuladores de alimentos.

No entanto, no decorrer da maturação, a contagem inicial de todos os grupos microbianos foi gradualmente reduzida a uma velocidade maior para os queijos que apresentavam no começo uma carga microbiana menor quando comparadas aos queijos dos produtores com uma carga contaminante maior (Tabela 10). A redução destes microrganismos observada durante a maturação sugere que eles podem ser inibidos por bactérias lácticas altamente competitivas que são capazes de suportar as condições de maturação. É bem conhecido que durante a

maturação as bactérias lácticas normalmente inibem os patógenos (Caridi et al., 2003; Manolopoulou et al., 2003). A taxa de redução na contagem de contaminantes também pode estar relacionada a uma diminuição no teor de umidade, à redução da atividade de água e ao aumento da concentração de NaCl. O teor de sal é um dos fatores que interferem diretamente na atividade de água ( $A_w$ ) do queijo, seguindo uma tendência proporcional invertida (Furtado; Lourenço Neto, 1994). Ao apresentar uma tendência para redução da contagem microbiológica durante a maturação, sugere-se que este processo seria favorecido se utilizado leite com boa qualidade microbiológica e procedimentos adequados de manipulação para produção de queijos.

**Tabela 10** - Médias de contagens das queijarias controle e contaminadas.

	Queijaria Controle	Queijaria Contami nada	Queijaria Controle	Queijaria Contami nada	Queijaria Controle	Queijaria Contami nada	Queijaria Controle	Queijaria Contami nada
Tempo (Dias)	Mesófilos aeróbios (Log UFC/g)		<i>E. coli</i> (Log UFC/g)		Coliformes totais (Log UFC/g)		<i>S. aureus</i> (Log UFC/g)	
0	8,16	8,26	4,79	5,73	7,34	6,44	5,98	5,01
7	8,03	8,04	4,00	4,66	5,18	5,90	4,00	4,95
15	6,74	7,43	3,44	4,00	4,70	5,26	3,44	4,47
21	6,46	6,52	2,82	4,00	3,96	4,97	3,27	4,42
30	5,17	5,47	1,00	1,00	3,23	4,60	1,65	2,52
45	4,52	5,26	1,00	1,00	2,02	4,28	1,59	2,47
60	4,04	5,20	1,00	1,00	2,24	3,15	1,00	1,50

Os resultados deste estudo mostram que os queijos produzidos, mesmo aqueles que apresentam menor taxa de redução microbiana durante a maturação, atingem os padrões legislativos (Minas Gérias, 2008). Porém, exigem período de maturação mais longo do que aqueles queijos com carga microbiana inicial mais baixa. Os queijos maturados à temperatura ambiente provenientes das queijarias 'controles' apresentaram contagens microbiológicas dentro dos padrões para todos os contaminantes a partir de 30 dias de maturação, enquanto os queijos das

queijarias 'contaminadas' precisaram de 60 dias de maturação para atingirem os critérios microbiológicos estabelecidos pela resolução nº 7 por Brasil (2000) para garantir a segurança de queijos produzidos com leite cru (Tabela 10).

Como o tempo de maturação estabelecido por lei é considerado longo, e a legislação federal prevê a redução deste período desde que a eficiência e inocuidade sejam comprovadas por estudos técnico-científicos.

De acordo com os resultados obtidos, todas as amostras de queijo analisadas apresentaram ausência de *L. monocytogenes* e *Salmonella sp.* devido provavelmente ao acúmulo de ácido láctico no meio e pelos baixos valores de pH, além de poder estar relacionado a incidência de outros microrganismos, já que estas espécies têm menos capacidade de competição frente aos coliformes e *Staphylococcus* (Brant; Fonseca; Silva, 2007). Estes dados são de extrema importância para a determinação definitiva das condições de maturação dos queijos artesanais, uma vez que se trata de um produto fabricado com leite cru. Nesse caso, a temperatura ambiente poderá ser uma aliada no combate aos contaminantes, favorecendo o metabolismo das BAL e o acúmulo de metabólitos responsáveis pela inibição e eliminação dos mesmos.

Em estudo semelhante, Martins et al. (2015) avaliaram 256 queijos do Serro e em uma amostra com 15 dias de maturação a temperatura de refrigeração ( $\pm 4$  °C) houve a detecção de *Salmonella sp.*, porém aos 22 dias, esse patógeno não estava mais presente. Nesse mesmo estudo, não houve a detecção de *L. monocytogenes*. Cardoso et al. (2013) não detectaram *Salmonella sp* em nenhuma das 100 amostras de queijo do Serro. Dores, Nobrega & Ferreira (2013) não detectaram *Listeria sp.* e nem *Salmonella sp.* em nenhuma das 32 amostras analisadas de queijo da Canastra durante os períodos de seca e chuva.

A inibição destes patógenos pode estar relacionada à exclusão competitiva por metabólitos produzidos pelas BAL e bioindicadores presentes no fermento endógeno durante a fermentação e maturação, além de fatores intrínsecos aos alimentos, como baixa  $A_w$ , alto teor de cloretos de sódio e diminuição do potencial de oxidorredução (Soares, 2014).

## **5.5 Biodiversidade bacteriana do queijo Entre Serras**

### **5.5.1 Identificação por sequenciamento de alto desempenho**

Métodos independentes de cultura são extremamente úteis para identificar comunidades microbianas e sua dinâmica populacional, bem como os seus papéis nas propriedades sensoriais e na qualidade dos alimentos fermentados. As vantagens desses métodos incluem a identificação de microrganismos viáveis, mas em estados não cultiváveis ou com baixos níveis populacionais, microrganismos que não conseguem se multiplicar em meios de cultura e condições geralmente usadas (Ferrocino e Cocolin, 2017). O sequenciamento de alto rendimento tem sido reconhecido como um método poderoso para a realização de tais estudos (Ercolini, 2013; Filippis, Parente, Ercolini, 2018). Considerando isso, usamos essa abordagem para obter informações sobre a assinatura bacteriana de queijos artesanais fabricados e maturados por quatro (A, B, C, D) diferentes produtores na região Entre Serras em Minas Gerais. Até onde sabemos, este é o primeiro estudo que utilizou o HTS para revelar a diversidade bacteriana do QMA produzido nessa região. Essas caracterizações são importantes para a região obter reconhecimento oficial como produtora de QMA.

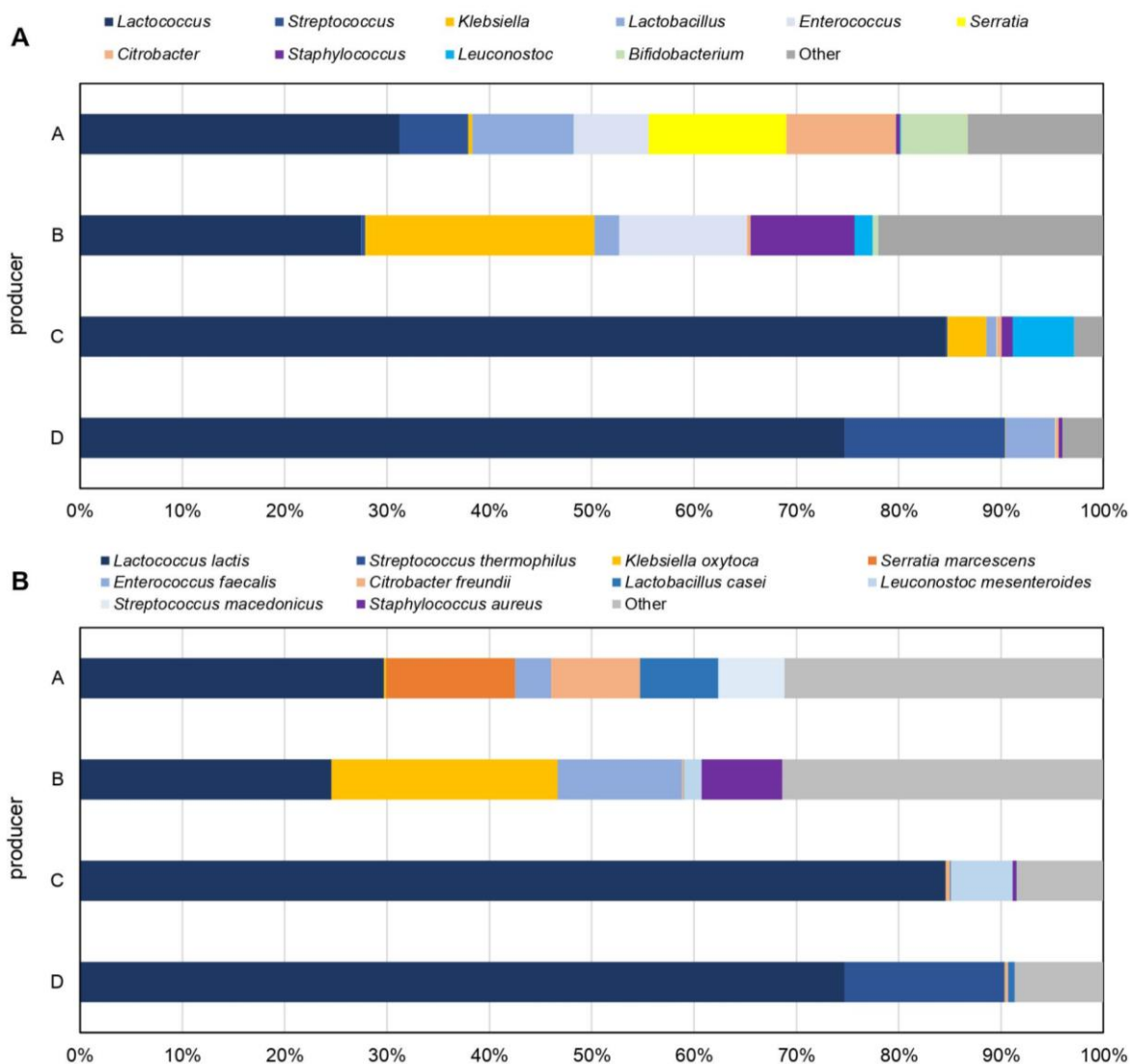
As comunidades bacterianas de queijos artesanais foram monitoradas durante os 60 dias de maturação. Um total de 825.728 reads foram obtidos após o filtro de qualidade, resultando em 20.868 OTUs. Detalhes sobre o número de reads, OTUs e número de gêneros e espécies identificados por amostra são mostrados na Tabela 11. Das amostras de 28 queijos artesanais, quatro apresentaram número de reads inferior a 5000 (S5, S16, S17 e S27 amostras), mas seus indicadores de qualidade de extração de DNA e sequenciamento foram aceitáveis. Apesar da limitação no número de reads, os dados dessas amostras são significativos, e foi confirmada pela comparação de suas proporções de população microbiana com amostras relacionadas (de pontos de tempo anteriores ou seguintes).

**Tabela 11** - Dados metagenômicos de queijos artesanais Entre Serras (n = 28).

Queijarias	Maturação (dias)	Identificação das amostras	Diversidade bacteriana			
			Leituras	OTUs	Genêro	Espécies
A	0	S1	59,241	4,530	60	101
	7	S6	33,672	4,068	61	117
	15	S10	40,747	4,393	63	124
	21	S14	38,867	4,304	60	111
	30	S18	8,846	1,712	52	97
	45	S22	6,306	421	45	58
	60	S26	40,302	4,246	52	108
B	0	S4	56,506	4,031	55	119
	7	S7	29,639	3,185	53	94
	15	S11	22,152	3,000	50	82
	21	S13	18,910	2,581	47	71
	30	S19	5,647	1,172	44	63
	45	S23	17,435	2,464	45	69
	60	S27	1,544	411	34	34
C	0	S2	58,973	2,738	52	86
	7	S8	29,520	1,793	47	68
	15	S12	53,104	2,338	50	71
	21	S16	1,210	260	26	23
	30	S20	31,113	1,868	45	51
	45	S24	9,676	900	31	25
	60	S28	38,476	2,052	44	57
D	0	S3	54,925	2,225	73	133
	7	S5	721	171	28	19
	15	S9	6,033	731	31	39
	21	S15	44,216	1,719	50	75
	30	S17	1,044	243	24	21
	45	S21	55,292	1,856	50	73
	60	S25	61,611	2,266	58	93
Total			825,728	20,868	113	327

Como esperado, as BAL foram identificadas entre os principais componentes do queijo “Entre Serra”, com *Lactococcus* aparecendo como o gênero dominante. *Enterococcus*, *Streptococcus*, *Lactobacillus* e *Leuconostoc* também foram prevalentes, como mostra a Figura 6; seus níveis variavam de produtor para produtor. No entanto, *Staphylococcus* e outros gêneros de coliformes e enterobactérias como *Klebsiella*, *Serratia* e *Citrobacter* foram identificados em alta

proporção (Figura 6). Da mesma forma, espécies dos gêneros predominantes foram identificadas nas amostras; *L. lactis* foi a espécie predominante nas amostras dos produtores C e D, enquanto a diversidade de espécies nas amostras dos produtores A e B foi variável (Figura 6).



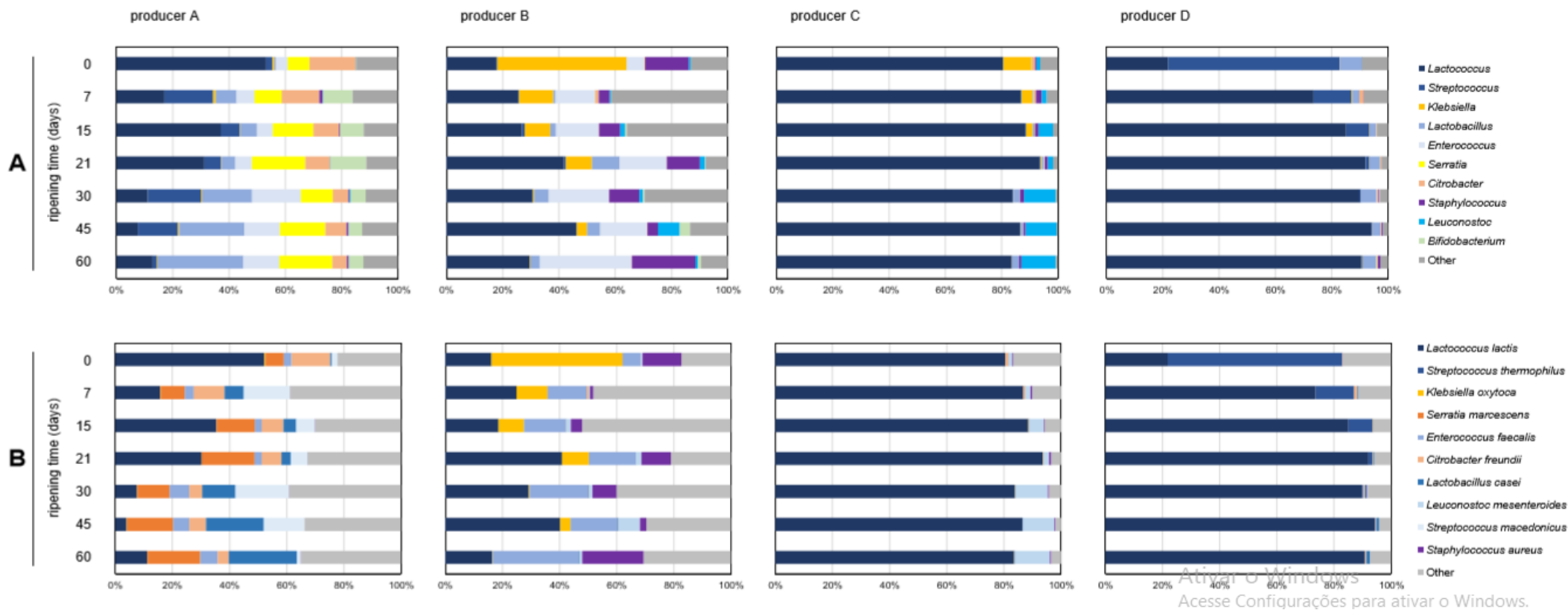
**Figura 66** - Abundância relativa (%) dos principais gêneros (A) e espécies (B) bacterianas encontrados nos queijos artesanais Minas Entre Serras produzidos por quatro queijarias (A, B, C, D). Os resultados foram obtidos com base em HTS de 16S rRNA.

A abundância relativa de gêneros e espécies bacterianas, bem como as mudanças ao longo do processo de maturação do queijo artesanal variaram de

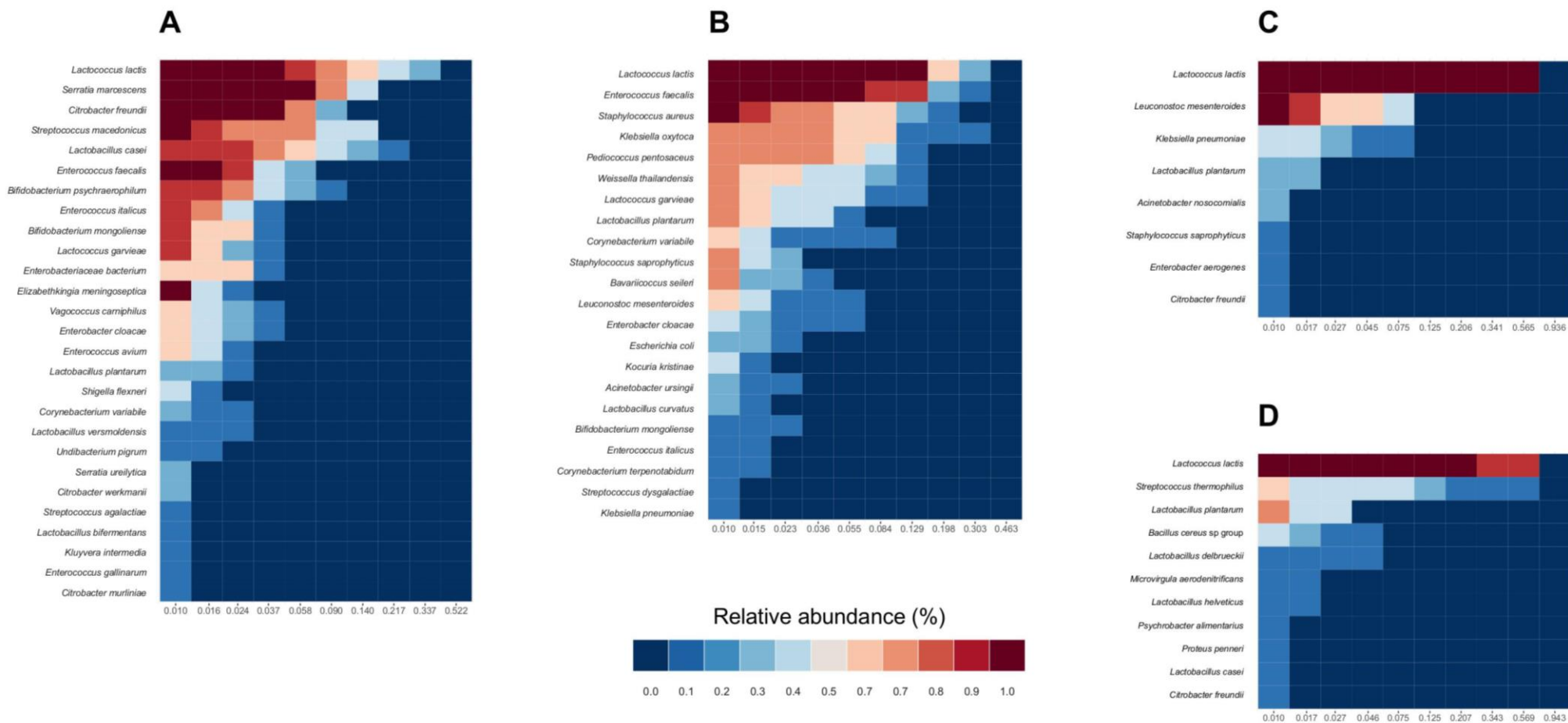


queijaria para queijaria de produção (A, B, C, D). A prevalência de *Lactococcus* diminuiu ao longo do tempo em queijos do produtor A, aumentou nos queijos dos produtores B e D, e permaneceu estável nos queijos do produtor C, enquanto a predominância de *Enterococcus* nos queijos das queijarias A e B aumentou ao longo do processo de maturação (Figura 7). Além disso, a prevalência de *Lactobacillus* e *Leuconostoc* cultivados em queijos das queijarias A e C, respectivamente, e *Streptococcus* diminuiu ao longo do tempo em queijos da queijaria D (Figura 7). Também foram identificadas alterações entre as bactérias contaminantes, com uma prevalência de *Citrobacter* que diminuiu ao longo do tempo em queijos da queijaria A, enquanto o contrário foi observado para *Serratia*. Nos queijos da queijaria B, a prevalência de *Klebsiella* diminuiu com o tempo, no entanto, o *Staphylococcus* aumentou um pouco (Figura 7).

Quanto à prevalência de espécies, as fazendas A e B exibiram ampla distribuição de espécies em seus queijos, enquanto *Lactococcus lactis* foi predominante nos queijos das queijarias C e D durante todo o período de maturação (Figura 7); curiosamente, os queijos produzidos nas queijarias C e D apresentaram fungos brancos em suas superfícies. As BAL desempenham um papel importante na produção artesanal de queijo e geralmente é o grupo microbiano dominante encontrado nas culturas de leite cru e de iniciação natural. Suas vias metabólicas são responsáveis por propriedades tecnológicas e biopreservação desejáveis (Favaro, Barretto Penna, Todorov, 2015; Kamimura, Magnani, et al., 2019; Montel et al., 2014). Embora a diversidade da microbiota entre queijarias seja muitas vezes extensa, a variabilidade no nível intra-queijarias é frequentemente muito menor (Montel et al., 2014). Embora sejam esperadas variações nos queijos artesanais de leite cru, os altos níveis de contaminantes refletem práticas inadequadas de higiene por parte dos produtores de queijo.



**Figura 77** – Perfil da microbiota bacteriana em queijos de diferentes produtores (A, B, C, D) localizados na região de Entre Serras ao longo do tempo e maturação. **A**, Abundâncias relativas (%) dos principais gêneros identificados nos queijos ao longo do período de maturação de 60 dias. **B**, Abundâncias relativas (%) das principais espécies identificadas nos queijos ao longo do período de maturação de 60 dias.



**Figura 8** - Microbioma de amostras de queijo artesanal Minas Entre Serras das queijarias A, B, C e D com base na identificação das espécies.

A microbiota dos queijos artesanais é determinada pelo leite cru, fermento artesanal utilizado, bem como pelo ambiente de produção e pelas condições de processamento. Esses fatores influenciam a qualidade do produto final e as propriedades sensoriais e determinam a identidade do queijo (De Filippis et al., 2016; Kamimura et al., 2020; Montel et al., 2014; Sant'Anna et al. al., 2019). O microbioma dos queijos estudados variou entre os quatro produtores (Figura 8). As espécies identificadas nas frequências mais altas foram: A, *Lactococcus lactis*, *Serratia marcescens* e *Citrobacter freundii*; B, *Lactococcus lactis*, *Enterococcus faecalis* e *Staphylococcus aureus*; C, *Lactococcus lactis*, *Leuconostoc mesenteroides* e *Klebsiella pneumoniae*; D, *Lactococcus lactis*, *Streptococcus thermophilus* e *Lactobacillus plantarum*.

Usando uma abordagem de cultura independente semelhante, Sant'Anna et al. (2019) revelaram que as bactérias predominantes no QMA da região da Serra do Salitre (*Streptococcus* e *Lactococcus*) foram originadas do fermento natural ("pingo"). Em geral, *Streptococcus* permaneceu predominante durante todo o período de maturação, e os níveis de *Lactococcus* diminuíram no núcleo e na casca do queijo durante o período de maturação. *Leuconostoc* emergiu em ambos, enquanto *Weissella* emergiu nas cascas e *Lactobacillus* nos núcleos. *Staphylococcus* foi mais prevalente nas cascas de queijo. No entanto, a microbiota também revelou uma diversidade entre as queijarias, como observado no presente estudo e indicado por outros (Kamimura et al., 2020; Perin et al., 2017; Resende et al., 2011).

De acordo com Kamimura, Magnani, et al. (2019) as BAL termofílicas (principalmente *Streptococcus*) são predominantes no QMA do Cerrado e do Serro, enquanto *Lactococcus* (mesofílico) é mais abundante nos queijos de Araxá, Campo das Vertentes e Canastra. As espécies de *Lactobacillus* foram identificadas nos queijos dessas cinco regiões, mas as proporções foram baixas, o que é semelhante aos nossos achados. Em outro estudo, *Lactobacillus* foi identificado como o gênero predominante no QMA de Serro, Canastra, Serra do Salitre, Araxá e Campo das Vertentes (Perin et al., 2017). No entanto, um número limitado de amostras e a metodologia escolhida podem explicar as discrepâncias observadas.

Um estudo recente sugeriu que *Lactococcus* e *Streptococcus* podem ter vantagens competitivas nos processos de fabricação/maturação do queijo Serra da Canastra (Kamimura et al., 2020). Isso poderia explicar sua alta abundância no QMA

(Kamimura, Magnani, et al., 2019), enquanto estudos baseados em métodos dependentes da cultura mostraram que BAL dos gêneros *Lactobacillus*, *Lactococcus* e *Enterococcus* são geralmente as principais bactérias isoladas do QMA (Castro et al., 2016; Lima et al., 2009; Luiz et al., 2017; Perin et al., 2017).

Em termos de qualidade e inocuidade, foram identificadas bactérias patogênicas deteriorantes e oportunistas nas amostras do QMA “Entre Serra”. Baixos níveis de *E. coli* foram detectados em quase metade das amostras e altos níveis de *Serratia marcescens* e *Citrobacter freundii* foram identificados em queijos obtidos na Fazenda A. Além disso, *Klebsiella oxytoca* e *Klebsiella pneumoniae* foram identificados entre os principais contaminantes das amostras de QMA obtidas das queijarias B e C, respectivamente. As espécies de Enterobacteriaceae são reconhecidas como responsáveis pelo estufamento precoce devido à fermentação da lactose (Tabla et al., 2016). Seus altos níveis em queijos das queijarias A e B sugerem práticas inadequadas de higiene durante a produção de queijo.

Além disso, altos níveis de *Enterococcus faecalis* e *S. aureus* foram detectados em queijos da queijaria B. A prevalência de *E. faecalis* em laticínios é bem documentada, e os *Enterococcus* podem desempenhar um papel benéfico na fermentação e maturação do queijo (Giraffa, 2003). No entanto, eles também podem produzir aminas biogênicas, adquirir e transferir genes relacionados à resistência a antibióticos e causar infecções em humanos como patógenos oportunistas (Graham, Stack, & Rea, 2020; Hanchi et al., 2018).

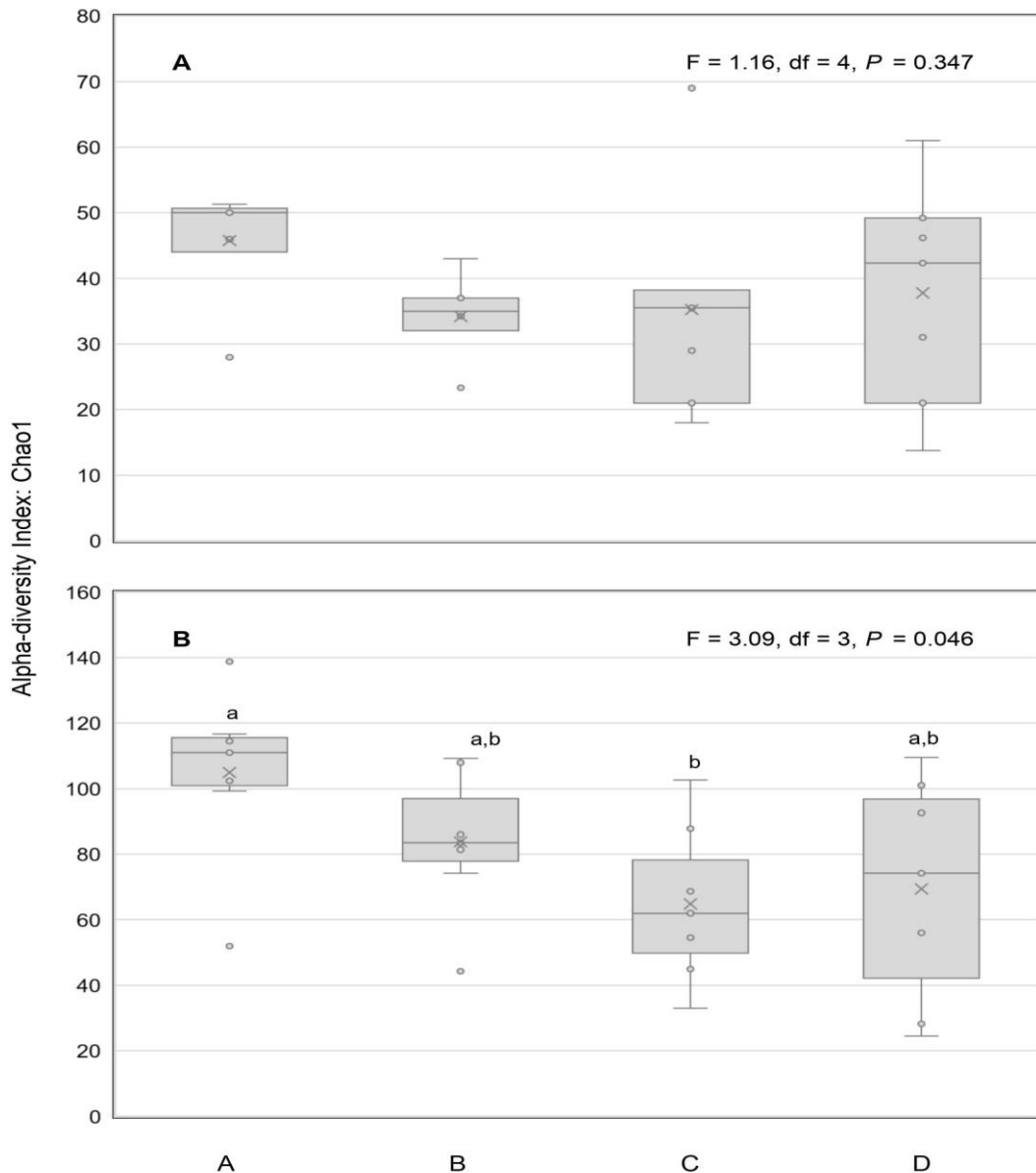
Uma alta prevalência de *S. aureus* não apenas indica más práticas de higiene, mas também gera preocupação com o estado sanitário do rebanho, uma vez que essa espécie é um dos principais agentes etiológicos da mastite contagiosa na produção de gado leiteiro (Zadoks et al., 2011). O surgimento de cepas resistentes a antimicrobianos, como *Staphylococcus* resistente à meticilina, é um desafio na produção pecuária (Vanderhaeghen et al., 2010). Além disso, algumas cepas que são capazes de produzir enterotoxinas podem contaminar produtos lácteos e causar intoxicação alimentar nos consumidores (Argudín, Mendoza e Rodicio, 2010; Pinchuk, Beswick e Reyes, 2010). A presença de enterotoxinas estafilocócicas nos queijos amostrados não foi avaliada, até o momento apenas um número limitado de estudos avaliou a presença dessas enterotoxinas no QMA. A maioria desses estudos determinou ausência (Andretta et al., 2019; Borelli et al., 2011) ou baixa ocorrência de amostras positivas (Cardoso et al., 2013).

Sequências correspondentes a *Salmonella bongori* foram detectadas nos queijos das queijarias A e B nos dias 0 e 7; as sequências permaneceram detectáveis até o dia 60 nos queijos produzidos pela queijaria A. Os queijos dessa mesma fazenda também carregaram sequências correspondentes a *Shigella flexneri* em todos tempos avaliados durante o período de maturação, embora não seja possível dizer se esse patógeno estava viável ou não. Com base na legislação brasileira que estabelece os critérios microbiológicos para alimentos, *Salmonella* sp. deve estar ausente em uma amostra de 25 g de queijo (Brasil, 2019). A abordagem utilizada não permitiu identificar nenhuma viabilidade de *Salmonella* uma vez que a metodologia HTS usada não distingue células viáveis de células mortas.

A maturação é um passo importante para a produção de queijo a partir de leite cru, pois influencia diretamente a qualidade, a inocuidade e a identidade do produto. No estado de Minas Gerais, 22 dias é o tempo mínimo de maturação estabelecido para o QMA produzido nas regiões de Campo das Vertentes, Canastra, Cerrado, Serra do Salitre e Triângulo Mineiro. 17 dias é o mínimo para QMA Serro e 14 dias para QMA Araxá (Araújo et al., 2020; IMA, 2017). Estudos anteriores indicam que esses tempos mínimos de maturação estabelecidos para QMA podem garantir a inocuidade e a qualidade do produto, eliminando patógenos como *Salmonella* e diminuindo a contagem de *S. aureus* (Figueiredo, 2018; Martins et al., 2015; Sales, 2015). No entanto, eles não são eficazes na eliminação de enterotoxinas estafilocócicas (Cardoso et al., 2013). No sul do Brasil, o tempo de maturação de 28 dias não foi totalmente eficaz na redução da contaminação microbiológica do queijo artesanal Serrano feito com leite cru de vaca, e *L. monocytogenes* foi detectada em amostras de queijo no final do período de maturação (Pontarolo et al., 2017). No presente estudo, o monitoramento microbiológico por métodos dependentes de cultura sugeriu que o QMA Entre Serras necessita de um período mínimo de maturação de 30 dias para garantir sua qualidade e segurança para as queijarias controles diferente das queijarias contaminadas que precisou de um tempo maior.

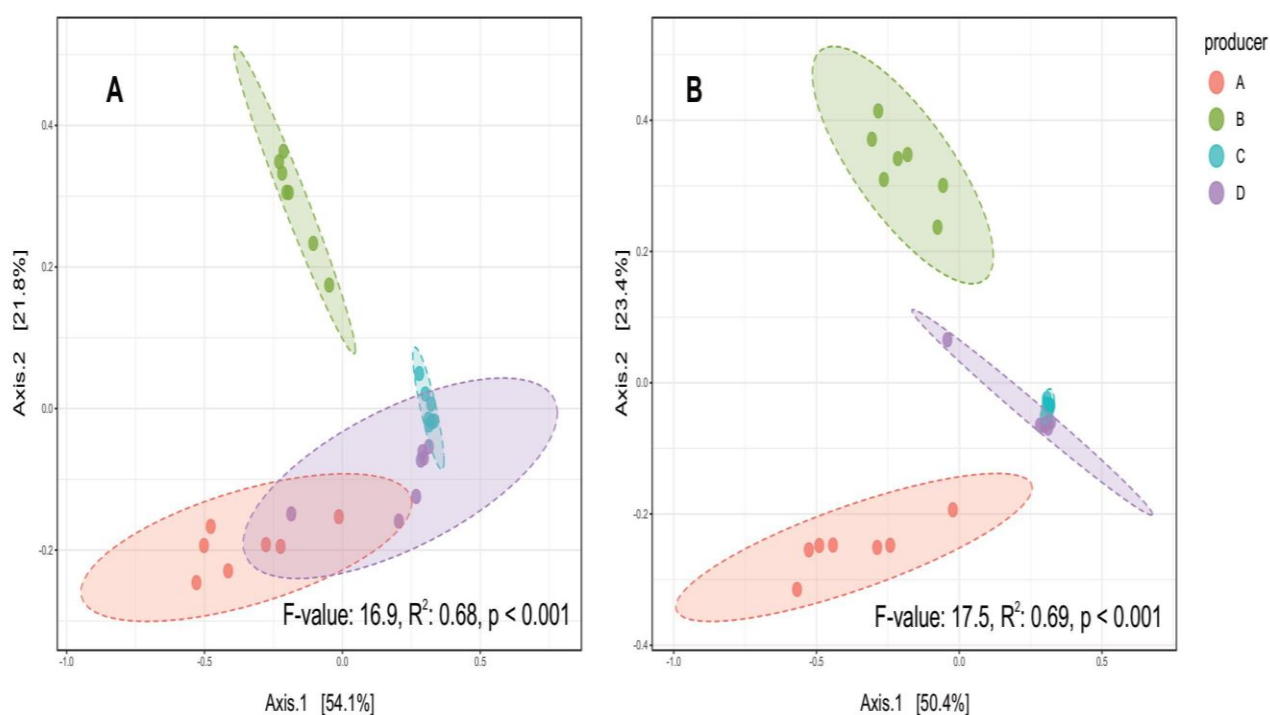
No presente estudo, a diversidade alfa foi medida pela análise do índice Chao1, permitindo estimar a diversidade bacteriana a partir de dados de abundância relativa (Kim et al., 2017). A Figura 9 mostra como os índices de Chao1 variaram significativamente quando os valores estimados de riqueza de espécies foram comparados considerando a produção das queijarias, considerando os dados das queijarias A e C ( $P < 0,05$ , Figura 9b). Entretanto, a comparação da diversidade de

gêneros entre as queijarias produtoras não resultou em diferenças significativas ( $P > 0,05$ , Figura 9a). Não foi observada significância estatística dos índices de Chao1 quando a diversidade de gêneros e espécies foi avaliada com base no tempo de maturação. Variações na riqueza dos produtores (A, B, C, D) podem ser influenciadas pela composição microbiana do leite cru, a cultura inicial, o ambiente de fabricação de queijos e os procedimentos utilizados pelas fazendas produtoras.



**Figura 9** - Índices de diversidade alfa (Chao1) de comunidades microbianas (A: gênero; B: espécie) identificados em amostras de queijo artesanal Minas “Entre Serra” ( $n = 28$ ) obtidas em quatro queijarias (A, B, C, D). O teste T/ANOVA indica diferenças significativas quando  $p < 0,05$ .

A análise das coordenadas principais (PCoA) revelou comunidades microbianas distintas entre algumas das queijarias (Figura 10). Diferenças estatísticas entre o gênero bacteriano e as espécies foram observadas entre as queijarias ( $p < 0,001$ , Figura 10), mas, novamente, não foram encontradas diferenças quando as amostras foram agrupadas por tempo de maturação. A produção do QMA Entre Serras segue um processo semelhante usado em outras regiões do estado de Minas Gerais. Isso implica o uso de leite de vaca cru e uma cultura de iniciação natural chamada "pingo". Esta cultura inicial é obtida a partir do soro de leite que é drenado do queijo produzido no dia anterior (Castro et al., 2016; Perin et al., 2017).



**Figura 80** - Análise de coordenadas principais (PCoA) plotagem de comunidades microbianas (A: gênero; B: espécies) identificadas em amostras de queijo Minas artesanal Entre Serras ( $n = 28$ ) obtidas de quatro queijarias (A, B, C, D). Os valores de PERMANOVA são indicados (F, R<sup>2</sup> e p).

Segundo Rafael (2017), as características dessas culturas iniciadoras variam significativamente entre diferentes fazendas localizadas na Serra da Canastra, uma região produtora de QMA bem reconhecida em Minas Gerais. Resultados anteriores indicam que o microbioma pode ser específico da fonte e variar de uma região para



outra ou mesmo de queijaria para queijaria, e o ecossistema específico pode determinar a microbiota dominante dos queijos. De acordo com Sant'Anna et al. (2019) *clusters* distintos obtidos pelo PCoA sugeriram uma adaptação ambiental específica pelas bactérias na Serra do Salitre, uma região que tradicionalmente produz QMA. Alguns dos pontos levantados acima podem explicar as diferenças significativas encontradas pelas análises de Chao1 e Bray-Curtis observadas entre as fazendas produtoras de queijo no presente estudo (Figuras 9 e 10).

## 6. CONCLUSÃO

O diagnóstico foi realizado e um relatório foi encaminhado para cada produtor com as características encontradas na sua produção e o que deveria ser alterado com base na legislação Minas Gerais (2018). Como conclusão geral, em primeiro aspecto é uma região que a cadeia produtiva do queijo minas Artesanal das Entre Serras é caracterizada pela presença da agricultura familiar, com a produção em pequena escala. Foram constatado problemas tecnológicos em alguns produtores, muitos deles não se enquadravam nas exigências da legislação. Também foi observado que não existia padronização para fabricação do QMA entre os produtores da região. A pesquisa mostrou dados importantes que podem ajudar nas tomadas de decisões quanto aos investimentos pelos produtores rurais, ou mesmo na elaboração de projetos para o apoiar os fabricantes de queijos na obtenção de reconhecimento e certificações.

As queijarias analisadas se encontravam em condições intermediárias de adequação devido ao não cumprimento de algumas exigências previstas na legislação, foram identificadas amostras de QMA Entre Serras com contagens de coliformes, *E. coli* e *S. aureus*, estando em desacordo com as normas brasileiras de qualidade e segurança. Os gêneros *Listeria* e *Salmonella* não foram detectados. As informações obtidas permitiram a identificação de pontos-chave de contaminação microbiológica no processamento de QMA, mostrando que programas de controle de qualidade e segurança devem ser adotados por esses produtores para que possam receber certificações. Mesmo tendo a presença de uma contagem superior à legislação brasileira atual os queijos têm aceitação no mercado e não apresentam estufamento precoce, indicando que o equilíbrio da microbiota pode estar controlando a multiplicação dos micro-organismos indicadores.

O período de maturação influenciou na redução das contagens de mesófilos aeróbios, coliformes totais, *E. coli* e *S. aureus*. O tempo recomendado de maturação para adequação do QMA Entre Serras variou de acordo com a queijaria analisada. Para as queijarias 'controle', os tempos mínimos para adequação aos parâmetros microbiológicos foram de 30 dias. As queijarias 'contaminadas' precisaram de um

tempo mínimo de maturação 60 dias, o tempo máximo de maturação estudado, para ser capaz de diminuir as contagens de coliformes totais, *E. coli* e *S. aureus* para níveis considerados seguros. Com base nos resultados, foi possível ampliar a compreensão sobre a diversidade microbiológica inter-regional do QMA.

O QMA é considerado uma importante fonte de BAL, que podem ser utilizadas para o desenvolvimento de novos fermentos na fabricação de derivados lácteos seguros e inovadores quanto às características sensoriais. Assim é necessária a continuação de trabalhos na região, com a adoção de metodologias participativas que atendam às expectativas dos produtores. Novos estudos precisam ser conduzidos em parceria entre os produtores (organizados em associações e, ou cooperativas), o governo, as instituições de pesquisa e extensão e demais órgãos interessados em somar esforços para o desenvolvimento do setor produtivo. Apesar de ser um processo lento e que exige um investimento por parte do governo, esta é uma alternativa segura para se valorizar a produção tradicional nessa região e estimular o melhoramento da qualidade dos queijos para garantir a sua comercialização em todo o Brasil.

## 7. REFERÊNCIAS

ALAIS, C. **Ciencia de la leche**. Principios de Técnica Lechera, Traducido por Don Antonio Lacasa Godina, Barcelona - España, Ed. Reverté, 2003.

ALMEIDA, G.; MAGALHÃES, R.; CARNEIRO, L.; SANTOS, I.; SILVA, J.; FERREIRA, V.; HOGG T.; TEIXEIRA P. Foci of contamination of *Listeria monocytogenes* in different cheese processing plants. **International Journal of Food Microbiology**, n.167, p. 303–309, 2013.

ANDRADE, C. R. **Diagnóstico da qualidade microbiológica de Queijo Serra da Canastra e caracterização de bactérias do gênero *Enterococcus***. Dissertação (Mestre em Tecnologia de Alimentos) - Faculdade de Engenharia de Alimentos da Universidade Estadual de Campinas. 2009. 112p

ANDRETTA, M., ALMEIDA, T. T., FERREIRA, L. R., CARVALHO, A. F., YAMATOGLI, R. S., & NERO, L. A. (2019). Microbial safety status of Serro artisanal cheese produced in Brazil. **Journal of Dairy Science**, 102(12), 10790–10798.

AOAC – Official Methods of AOAC International. **Aerobic count in milk and dairy products**. 2000.

AOAC – Official Methods of AOAC International. **Rapid Enumeration of *Staphylococcus aureus* in Selected Foods**. 2001.

ARAÚJO, J. P. A., CAMARGO, A. C., CARVALHO, A. F., & NERO, L. A. (2020). Uma análise histórico-crítica sobre o desenvolvimento das normas Brasileiras relacionadas a queijos artesanais. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, 72(5), 1845–1860.

ARGUDÍN, M.Á., MENDOZA, M. C., & RODICIO, M. R. Food Poisoning and *Staphylococcus aureus* Enterotoxins. **Toxins**, 2(7), 1751–1773, 2010.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE INDÚSTRIA DE QUEIJO (ABIQ). Produção de queijo no Brasil, 2017.

BECH, A.M. Characterizing Ripening in UF-cheese. **International Dairy Journal**, v.3, p.329-342, 1993. Disponível em acesso em 17/01/2018

BRAGA, M. A. C. **Produção artesanal do queijo de leite cru: dilemas do desenvolvimento agrícola brasileiro**. 2018. 276p. Tese (Doutorado em Direito) – Universidade de São Paulo, 2018.

BRANT, L. M. F.; FONSECA, L. M.; SILVA, M. C. C. Avaliação da qualidade microbiológica do queijo-de-minas artesanal do Serro-MG. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.59, n.6, p.1570-1574, 2007.

BORGES, M. F.; ARCURI, E. F.; PEREIRA, J. L. . *Staphylococcus* enterotoxigênicos em leite e produtos lácteos, suas enterotoxinas e genes associados: revisão. **B.**

**Ceppa**, v. 26, n.1, p 71-86, 2008.

BORELLI, B. M.; FERREIRA, E. G.; LACERDA, I. C. A.; SANTOS, D. A.; CARMO, L.S.; DIAS, R. S.; SILVA, M. C. C.; ROSA, C. A. Enterotoxigenic *Staphylococcus* spp. and other microbial contaminants during production of Canastra Cheese, Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**. v. 37, p.545-550, 2006.

BORELLI, B. M., LACERDA, I. C. A., BRANDÃO, L. R., VIANNA, C. R., FERREIRA, M. C., GOMES, F. C. O., ... ROSA, C. A. Identification of *Staphylococcus* spp. isolated during the ripening process of a traditional minas cheese. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, 63, 481–487, 2011.

BRASIL. Lei nº 1.283, de 18 de dezembro de 1950. Dispõe sobre a inspeção industrial e sanitária dos produtos de origem animal. Rio de Janeiro, 18 de dezembro de 1950.

BRASIL. Decreto nº 30.691, de 29 de março de 1952. Aprova o novo Regulamento da Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal. Rio de Janeiro, 29 de março de 1952.

BRASIL. Lei nº 7.889, de 23 de novembro de 1989. Dispõe sobre inspeção sanitária e industrial dos produtos de origem animal, e dá outras providências. Brasília, 23 de novembro de 1989.

BRASIL. Ministério de Estado da Agricultura, do Abastecimento e da Reforma Agrária. Portaria nº 146, de 7 de março de 1996. Aprova os Regulamentos Técnicos de Identidade e Qualidade dos Produtos Lácteos. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 7 março de 1996.

BRASIL (1996). Ministério do Desenvolvimento, Indústria e Comércio Exterior. Lei nº 9.279 de 14 de maio de 1996. Regula direitos e obrigações relativos à propriedade industrial. In. Brasília: **Diário Oficial da União**, 15 de maio de 1996.

BRASIL. Ministério da Agricultura e do Abastecimento. Resolução nº 7, de 28 de novembro de 2000. Oficializa os Critérios de Funcionamento e de Controle da Produção de Queijarias, para seu Relacionamento junto ao Serviço de Inspeção Federal. **Diário Oficial da União**, Brasília, 28 de novembro de 2000.

BRASIL (2001). Ministério da Saúde. Resolução RDC nº 12, de 2 de janeiro de 2001. Aprova o regulamento técnico sobre padrões microbiológicos para alimentos. In. Brasília: **Diário Oficial da União**, seção 1, 10 de janeiro de 2001.

BRASIL. Ministério da Agricultura e do Abastecimento. Instrução Normativa nº 30, de 26 de junho de 2001. Aprova os Regulamentos Técnicos de Identidade e Qualidade de Manteiga de Terra ou Manteiga de Garrafa; Queijo de Coalho e Queijo de Manteiga. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 26 junho de 2001.

BRASIL. Resolução Nº. 375, de 17 de março de 2005. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil, Brasília, Mar. 2005.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 57, de 15 de dezembro de 2011. Permite que os queijos artesanais tradicionalmente elaborados a partir de leite cru sejam maturados por um período inferior a 60 (sessenta) dias, quando estudos técnico-científicos comprovarem que a redução do período de maturação não compromete a qualidade e a inocuidade do produto. **Diário Oficial da União**, Brasília, 15 de dezembro 2011.

BRASIL. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. Instrução normativa nº 30, de 7 de agosto de 2013. Permite que os queijos artesanais tradicionalmente elaborados a partir de leite cru sejam maturados por um período inferior a 60 (sessenta) dias, quando estudos técnico-científicos comprovarem que a redução do período de maturação não compromete a qualidade e a inocuidade do produto. Brasília, 30 de agosto de 2013.

BRASIL. Decreto nº 9.013, de 29 de março de 2017. Regulamenta a Lei nº 1.283, de 18 de dezembro de 1950, e a Lei nº 7.889, de 23 de novembro de 1989, que dispõem sobre a inspeção industrial e sanitária de produtos de origem animal. **Diário Oficial da União**, Brasília, 30 março de 2017.

BRASIL. Lei nº 13.680, de 14 de junho de 2018. Altera a Lei nº 1.283, de 18 de dezembro de 1950, para dispor sobre o processo de fiscalização de produtos alimentícios de origem animal produzidos de forma artesanal. **Diário Oficial da União**, 15 de junho de 2018.

BRASIL. Lei nº 13.860, de 18 de julho de 2019. Dispõe sobre a elaboração e a comercialização de queijos artesanais e dá outras providências. **Diário Oficial da União**, 18 de julho de 2018.

BRASIL. Decreto nº 9.918, de 18 de julho de 2019. Regulamenta o art. 10-A da Lei nº 1.283, de 18 de dezembro de 1950, que dispõe sobre o processo de fiscalização de produtos alimentícios de origem animal produzidos de forma artesanal. **Diário Oficial da União**, Brasília, 18 de julho de 2019.

BRASIL. Instrução Normativa nº 60, de 23 de dezembro de 2019. Estabelece as listas de padrões microbiológicos para alimentos prontos para oferta ao consumidor. **Diário Oficial da União**, Brasília, 26 de dezembro de 2019.

BRASIL. Ministério da Saúde. Surtos de Doenças Transmitidas por Alimentos no Brasil, INFORME 2018. Disponível em: <http://portalarquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2019/fevereiro/15/Apresenta----o-Surtos-DTA---Fevereiro-2019.pdf>. Acesso em: fevereiro 2021.

BRITO., J.R.F. BRITO, E.M. SANTOS, E.F. ARCURI, C.C. LANGE, M.A. BRITO, G.N. SOUZA, M.M. CERQUEIRA, J.M.S. BELTRAN, J.E. CALL, Y. LIU Retail survey of Brazilian milk and minas frescal cheese and a contaminated dairy plant to establish prevalence, relatedness, and sources of *Listeria monocytogenes* isolates. **Applied and Environmental Microbiology**., 74, pp. 4954-496, 2008.

CAMACHO, C., COULOURIS, G., AVAGYAN, V., MA, N., PAPADOPOULOS, J., BEALER, K., MADDEN, T. L. BLAST+: Architecture and applications. **BMC**

**Bioinformatics**, 10(1), 421, 2009.

CAPORASO, J. G., LAUBER, C. L., WALTERS, W. A., BERG-LYONS, D., LOZUPONE, C. A., TURNBAUGH, P. J., KNIGHT, R. 2011. Global patterns of 16S rRNA diversity at a depth of millions of sequences per sample. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, 108 (Supplement 1), 4516–4522.

CARIDI A., MICARI P., FOTI F. Ripening and seasonal changes in microbiological and chemical parameters of the artisanal cheese Caprino d'Aspromonte producer from raw or thermized goat's milk. **Food Microbiol** 20:201–209, 2003.

CARDOSO, V. M.; DIAS, R. S.; SOARES, B. M.; CLEMENTINO, L. A.; ARAÚJO, C.P.; ROSA, C. A. The influence of ripening period length and season on the microbiological parameters of a traditional Brazilian cheese. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 44, i. 3, p. 743-749, 2013.

CARR. FJ CARR, D. CHILL, N. MAIDA. As bactérias do ácido láctico: um levantamento da literatura. **Critical Reviews in Microbiology**, 28 (2002), pp. 281 – 370, 2002.

CASTRO, R. D., OLIVEIRA, L. G., SANT'ANNA, F. M., LUIZ, L. M. P., SANDES, S. H. C., SILVA, C. I. F., SILVA, A. M., NUNES, A. C., PENNA, C. F. A. M., & SOUZA, M. R. Lactic acid microbiota identification in water, raw milk, endogenous starter culture, and fresh Minas artisanal cheese from the Campo das Vertentes region of Brazil during the dry and rainy seasons. **Journal of Dairy Science**, 99(8), 6086–6096, 2016.

CHONG, J., LIU, P., ZHOU, G., XIA, J. Using MicrobiomeAnalyst for comprehensive statistical, functional, and meta-analysis of microbiome data. **Nature Protocols**, 15(3), 799–821, 2020.

COLLINS, Y. F.; MCSWEENEY, P. L. H; WILKINSON, M. G. Lipolysis and free fatty acid catabolism in cheese: a review of current knowledge. **International Dairy Journal**, v. 13, p. 841-866, 2003.

COLLINS, Y. F.; MCSWEENEY, P. L. H; WILKINSON, M. G. In: Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology. **Lipolysis and Catabolism of Fatty Acids in Cheese**. London: Elsevierl, 2004, v.1: General Aspects, (3 ed). p. 373-385, 2004.

CHRISTOFF, A. P., SEREIA, A. F. R., BOBERG, D., MORAES, R., & OLIVEIRA, L. Bacterial identification through accurate library preparation and high-throughput sequencing. **Neoprosecta Microbiome Technologies**, 25, 2017.

DALMASSO, M.; JORDAN, K. Absence of growth of *Listeria monocytogenes* in naturally contaminated Cheddar cheese. **Journal of Dairy Research**, n. 81, p. 46-53, 2014.

DE FILIPPIS, F., GENOVESE, A., FERRANTI, P., GILBERT, J. A., & ERCOLINI, D. Metatranscriptomics reveals temperature-driven functional changes in microbiome impacting cheese maturation rate. **Scientific Reports**, 6(1), 21871, 2016.

DHARIWAL, A., CHONG, J., HABIB, S., KING, I. L., AGELLON, L. B., XIA, J. MicrobiomeAnalyst: A web-based tool for comprehensive statistical, visual and meta-analysis of microbiome data. **Nucleic Acids Research**, 45(W1), W180–W188, 2017.

DORES, M.T. **Queijos artesanais da Canastra maturado a temperatura ambiente e sob refrigeração**. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos). Viçosa, MG: UFV, 2007. 106p.

DORES, M.T.; FERREIRA, C.L.L.F. Queijo Minas Artesanal, tradição centenária: ameaças e desafios. **Revista Brasileira de Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável**, v.2, p.26-34, 2012.

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

ECK, A. **O queijo**. Edição no 137.024/5.141. Vol. 1, Coleção EUROAGRO, Portugal: Publicações Europa-América, 1987.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA. Queijo minas artesanal agrega tradição cultural e valor para os produtores de leite. Disponível em: <https://www.embrapa.br/busca-de-noticias/-/noticia/35193841/queijo-minas-artesanal-agrega-tradicao-cultural-e-valor-para-os-produtores-de-leite>. Acesso em: fevereiro 2021.

EMPRESA DE ASSISTÊNCIA TÉCNICA E EXTENSÃO RURAL DE MINAS GERAIS –EMATER-MG. Programa Queijo Minas Artesanal é referência para outros Estados. Disponível em: [http://www.emater.mg.gov.br/portal.cgi?flagweb=novosite\\_pagina\\_interna&id=21494](http://www.emater.mg.gov.br/portal.cgi?flagweb=novosite_pagina_interna&id=21494). Acesso em: dezembro 2020.

ERCOLINI, D. High-throughput sequencing and metagenomics: moving forward in the culture-independent analysis of food microbial ecology. **Applied and Environmental Microbiology**, 79(10), 3148–3155, 2013.

FAVARO, L., BARRETTO PENNA, A. L., & TODOROV, S. D. Bacteriocinogenic LAB from cheeses – Application in biopreservation? **Trends in Food Science & Technology**, 41(1), 37–48, 2015.

FEITOSA, T.; BORGES, M. F.; NASSU, R. T.; AZEVEDO, E. H. F.; MUNIZ, C. R. Pesquisa de *Salmonella* sp., *Listeria* sp. e microrganismos indicadores higiênico-sanitários em queijos produzidos no estado do Rio Grande do Norte. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 23, suplemento, p.162-165, 2003.

FERRAZ, W.M. **Queijo Minas artesanal da Serra da Canastra: influência do ambiente sobre a maturação**. 93p. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos). Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Sudeste de Minas Gerais- Campus Rio Pomba, Minas Gerais. 2016.



FERREIRA, C. L. L. F. Fatores que afetam o crescimento de microrganismos em queijo. **Revista Leite e Derivados**. Ano XIII, n. 76. p. 91-96. Mar/Abr 2004.

FERREIRA, R. M.; SPINI, J. C. M.; CARRAZZA, L. G. Quantificação de coliformes fecais e termotolerantes em queijo Minas artesanal. **Pubvet**, v. 5, n. 5, 2011.

FERROCINO, I., COCOLIN, L. Current perspectives in food-based studies exploiting multi-omics approaches. **Current Opinion in Food Science**, 13, 10–15. 2017.

FIGUEIREDO, L. V. D. Maturação e características de qualidade do Queijo Minas Artesanal do Serro - MG. Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri. 2018.

FILIPPIS, F. D., PARENTE, E., & ERCOLINI, D. Recent past, present, and future of the food microbiome. **Annual Review of Food Science and Technology**, 9(1), 589–608, 2018.

FINGER, J. A. F. F.; BARONI, W. S. G. V.; MAFFEI, D. F.; BASTOS, D. H. M.; PINTO, U. M. Overview of Foodborne Disease Outbreaks in Brazil from 2000 to 2018. **Foods**, v. 8, i. 10, p. 434, 2019.

FOX, P.F.; GUINEE, T.O.; COGAN, T.M.; McSWEENEY, P. L. H. Biochemistry of cheese ripening. In: FOX, P. F. **Cheese: chemistry, physics and microbiology**, London: Chapman & Hall, p. 389-439, v.1, 1997

FOX, P. F.; GUINEE, T. P.; COGAN, T. M.; MCSWEENEY, P. L. H. **Fundamentals of cheese science**. Massachusetts: Kluwer Academic, 2000.

FRANCO, B. D. G. M.; LANDGRAF, M. **Microbiologia dos alimentos**. 3. ed. São Paulo: Atheneu, 196p, 2008.

FREITAS, R.; CHUAT V.; MADEC, M. N.; NERO, L. A.; THIERRY, A.; VALENCE, F.; CARVALHO, A. F. Biodiversity of dairy Propionibacterium isolated from dairy farms in Minas Gerais, Brazil. **International Journal of Food Microbiology**.v. 203, p. 70-77. 2015.

FURTADO, M. M.; LOURENÇO NETO, J. P. M. **Tecnologia de queijos: Manual técnico para a produção industrial de queijos**. São Paulo: Editora Dipemar Ltda., 1994.

GIRAFFA, G. Functionality of enterococci in dairy products. **International Journal of Food Microbiology**, 88(2), 215–222, 2003.

GONZALEZ AGM, ROSA ACP, ANDRADE JRC, TIBANA A. Enteropathogenicity markers in *Escherichia coli* strains isolated from soft white cheese and poultry in Rio de Janeiro, Brazil. **Food Microbiology**; 17:321–328, 2000.

GRAHAM, K., STACK, H., & REA, R. Safety, beneficial and technological properties

of enterococci for use in functional food applications – A review. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, 1–26, 2020.

GUEDES NETO, L. G. **Caracterização da produção artesanal e industrial de queijo de coalho em Pernambuco, de sua microbiota e avaliação das propriedades de suas bactérias ácido-láticas**. Tese (Doutorado em Veterinária) 155 f. Escola de Veterinária, 94 Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2008.

HANCHI, H., MOTTAWEA, W., SEBEI, K., & HAMMAMI, R. The genus enterococcus: Between probiotic potential and safety concerns—An update. **Frontiers in Microbiology**, 9(1791), 2018.

HITCHINS, A.D.; HARTMAN, P.A.; TODD, E.C.D. **Compendium of methods for the microbiological examination of foods: Coliforms-*Escherichia coli* and its toxins**. 3.ed. Washington: American Public Health Association, p.325-369,1996.

IMA (2017). Instituto Mineiro de Agropecuária. Portaria IMA nº 1.736 de 27 de julho de 2017. Altera a Portaria nº 1.305/2013, de 30 de abril de 2013, que dispõe sobre o período de maturação do Queijo Minas Artesanal. In. Belo Horizonte: **Diário Oficial do Estado de Minas Gerais**, 28 de julho de 2017.

IMA. (2020). Instituto Mineiro de Agropecuária In (Vol. 2020).

IPHAN. Instituto do Patrimônio Histórico e Artístico Nacional. Queijo artesanal de minas, patrimônio cultural do Brasil. v. 1, 2006. 156p. Disponível em: [http://portal.iphan.gov.br/uploads/ckfinder/arquivos/Dossie\\_modos\\_fazer\\_queijo\\_minas.pdf](http://portal.iphan.gov.br/uploads/ckfinder/arquivos/Dossie_modos_fazer_queijo_minas.pdf). Acesso em: 10 jan 2021.

ISO 11290-1. **Horizontal method for the detection and enumeration of *Listeria monocytogenes*** – Part 1: Detection method. 1996.

JAY, J. M. **Microbiologia de alimentos**. 6. ed. Porto Alegre: Artmed, 2005. 712 p.

JOHLER, S.; MACORI, G.; BELLIO, A.; ACUTIS, P. L.; GALLINA, S.; DECASTELLI, L. Short communication: Characterization of *Staphylococcus aureus* isolated along the raw milk cheese production process in artisan dairies in Italy. **Journal of Dairy Science**, v. 101, p. 2915-2920, 2018.

KAMIMURA, B. A., MAGNANI, M., LUCIANO, W. A., CAMPAGNOLLO, F. B., PIMENTEL, T. C., ALVARENGA, V. O., SANT'ANA, A. S. Brazilian artisanal cheeses: An overview of their characteristics, main types and regulatory aspects. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, 18(5), 1636–1657, 2019.

KAMIMURA, B. A., CABRAL, L., NORONHA, M. F., BAPTISTA, R. C., NASCIMENTO, H. M., SANT'ANA, A. S. Amplicon sequencing reveals the bacterial diversity in milk, dairy premises and Serra da Canastra artisanal cheeses produced by three different farms. **Food Microbiology**, 89, 103453, 2020.

KIM, B.-R., SHIN, J., GUEVARRA, R., LEE, J. H., KIM, D. W., SEOL, K.-H., ... ISAACSON, R. E. Deciphering diversity indices for a better understanding of microbial communities. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, 27(12), 2089–2093, 2017.

KOUSTA M, MATARAGAS M, SKANDAMIS P, DROSINOS E.H. Prevalence and sources of cheese contamination with pathogens at farm and processing levels. **Food Control**; 21:805–815, 2010.

LEITE JUNIOR, A. F. S.; FLORENTINO, E. R.; OLIVEIRA, E. B.; TORRANO, A.D. M. Qualidade microbiológica do queijo de coalho comercializado à temperatura ambiente ou sob refrigeração, em Campina Grande-PB. **Revista Higiene Alimentar**, v.14, n.73, p.53-59, 2000.

LIMA, C. D. L. C., LIMA, L. A., CERQUEIRA, M. M. O. P., FERREIRA, E. G., & ROSA, C. A. Lactic acid bacteria and yeasts associated with the artisanal Minas cheese produced in the region of Serra do Salitre, Minas Gerais. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, 61(1), 266–272. 2009.

LUIZ, L., CASTRO, R., SANDES, S., SILVA, J., OLIVEIRA, L., SALES, G., ... SOUZA, M. Isolation and identification of lactic acid bacteria from Brazilian Minas artisanal cheese. *CyTA - Journal of Food*, 15(1), 125–128, 2017.

MANOLOPOULOU E, SARANTINOPOULOS P, ZOIDOU E et al. Evolution of microbial populations during traditional Feta cheese manufacture and ripening. **International Journal Food Microbiology** 82:153–161, 2003.

MAPA. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. Serviço de Inspeção Federal (SIF). 2017. Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br/assuntos/inspecao/produtos-animal/sif>. Acesso em: janeiro 2021.

MARTINS, J.M. **Características físico-químicas e microbiológicas durante a maturação do queijo Minas artesanal da Região do Serro**. Tese (Doutorado em Ciência e Tecnologia de Alimentos). Viçosa, MG: UFV, 158p. 2006.

MARTINS, J. M.; GALINARI, E.; PIMENTEL-FILHO, N. J.; RIBEIRO J. R.; FURTADO, M. M.; FERREIRA, C. L. L. F. Determining the minimum ripening time of artisanal Minas cheese, a traditional Brazilian cheese. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 46, n.1, p.219-230, 2015.

MARTINS, M. C. F.; FREITAS, R.; DEUVAUX, J. C.; ELLER, M. R.; NERO, L. A.; CARVALHO, A. F. Bacterial diversity of artisanal cheese from the Amazonian region of Brazil during the dry and rainy seasons. **Food Research International**. v. 108, p.295 – 300. 2018.

MATA, G. M. S. C.; MARTINS, E.; MACHADO, S. G.; PINTO, M. S.; CARVALHO, A.F.; VANETTI, M. C. D. Performance of two alternative methods for *Listeria* detection throughout Serro Minas cheese ripening. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 47, p. 749-756, 2016.

MAYEUX JV, SANDINE WE, ELLIKER PR. A selective medium for detecting *Leuconostoc* in mixed-strain starter cultures. **Journal Dairy Science**.45: 655-656, 1962.

McSWEENEY, P. L. H.; SOUSA M. J. Biochemical pathways for the production of flavor compounds in cheeses during ripening: a review. **Lait, Les Ulis**, v. 80, p. 293-324, 2000.

McSWEENEY, P. L.H. Biochemistry of cheese ripening. **International Journal of Dairy Technology**. v. 57, n. 2/3, p. 127-144, maio/agosto 2004.

McSWEENEY, P.; FOX, P.; COTTER, P.; EVERETT, D. Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology. Academic press, ed. 4, 2017.

MELO, J.; ANDREW, P. W.; FALEIRO, M. L. *Listeria monocytogenes* in cheese and dairy environment remains a food safety challenge: The role of stress responses. **Food Research International**, v. 67, p. 75-90, 2015.

MONTEL, M. C.; BUCHIN S.; MALLET A.; DELBES-PAUS C.; VUITTON D.A.; DESMASURES, N.; BERTHIER, F. Traditional cheeses: Rich and diverse microbiota with associated benefits. **International Journal of Food Microbiology**, v. 177, p. 136-154, 2014.

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. Belo Horizonte: Assembléia Legislativa do Estado de Minas Gerais, 2002a. Disponível em: Acessado em janeiro de 2021.

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 de queijo Minas artesanal e dá outras providências. Belo Horizonte: Assembléia Legislativa do Estado de Minas Gerais, 2002b. Disponível em: Acessado em janeiro de 2021.

MINAS GERAIS. **Assembleia Legislativa do Estado de Minas Gerais. Decreto nº44.864 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 Minas artesanal. Belo Horizonte: Assembleia Legislativa do Estado de Minas Gerais, 2008. Disponível em: <<http://www.almg.gov.br/>>. Acesso em: dezembro. 2020.

MINAS GERAIS. Portaria IMA nº 517, de 14 junho de 2002. Estabelece normas de defesa sanitária para rebanhos fornecedores de leite para produção de queijo minas artesanal. Belo Horizonte, 14 jun. 2002.

MINAS GERAIS. Portaria IMA nº 518, de 14 junho de 2002. Dispõe sobre requisitos básicos das instalações, materiais e equipamentos para a fabricação do queijo minas artesanal. Belo Horizonte, 14 jun. 2002.

MINAS GERAIS. Portaria IMA nº 523, de 14 junho de 2002. Dispõe sobre as

condições higiênico-sanitárias e boas práticas na manipulação e fabricação do queijo minas artesanal. Belo Horizonte, 14 jun. 2002.

MINAS GERAIS. Assembleia Legislativa do Estado de Minas Gerais. Decreto nº44.864 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 Minas artesanal. Belo Horizonte: Assembleia Legislativa do Estado de Minas Gerais, 2008. Disponível em: <<http://www.almg.gov.br/>>. Acesso em: fevereiro 2021.

MINAS GERAIS. Lei nº 19.583 de 17 de agosto de 2011. Dispõe sobre as condições para manipulação e beneficiamento artesanais de leite de cabra e de ovelha e de seus derivados. **Diário Oficial Eletrônico de Minas Gerais**, Belo Horizonte, 17 ago. 2011.

MINAS GERAIS. Lei nº 20.549, de 18 de dezembro de 2012. Dispõe sobre a produção e a comercialização dos queijos artesanais de Minas Gerais. Minas Gerais, Belo Horizonte, 19 dez. 2012. Diário do Executivo, p. 1.

MINAS GERAIS. Portaria IMA nº 1.305. Estabelece diretrizes para a produção do queijo Minas artesanal. Belo Horizonte, 30 abr. 2013.

MINAS GERAIS. Lei nº 21.429, de 21 de julho de 2014. Altera a Lei nº 19.583, de 17 de agosto de 2011, que dispõe sobre as condições para manipulação e beneficiamento artesanais de leite de cabra e de ovelha e de seus derivados. Diário Oficial Eletrônico de Minas Gerais, Belo Horizonte, 21 jul. 2014.

MINAS GERAIS. Portaria IMA nº 1736, de 27 de julho de 2017. Altera a Portaria nº 1.305/2013, de 30 de abril de 2013, que dispõe sobre o período de maturação do Queijo Minas Artesanal. Belo Horizonte, 27 jul. 2017.

MINAS GERAIS. Lei nº 23157 de 18 de dezembro de 2018. Dispõe sobre a produção e a comercialização dos queijos artesanais de Minas Gerais. Diário Oficial Eletrônico de Minas Gerais, Belo Horizonte, 19 dez. 2018.

MINAS GERAIS. Portaria IMA nº 2051, de 07 de abril de 2021. Define o período de Maturação do Queijo Minas Artesanal produzido nas microrregiões de Araxá, Campo das Vertentes, Canastra, Cerrado, Serra do Salitre, Serro e Triângulo Mineiro. Belo Horizonte, 07 abril 2021.

MINAS GERAIS. Portaria IMA nº 2016, de 26 de novembro de 2020. Identifica a Região Serras da Ibitipoca como Produtora do Queijo Minas Artesanal e Revoga a Portaria IMA nº 1834, de 04 de julho de 2018. Belo Horizonte, 26 nov 2020.

MONTEL, M. C.; BUCHIN S.; MALLETT A.; DELBES-PAUS C.; VUITTON D.A.; DESMASURES, N.; BERTHIER, F. Traditional cheeses: Rich and diverse microbiota with associated benefits. **International Journal of Food Microbiology**, v. 177, p. 136-154, 2014.

MORENO, V. J. **Caracterização física e queijo físico-químico Minas de Microrregião Campo das Vertentes**. Juiz de Fora: UFJF, 2013, 131p (Dissertação

de Mestrado - Ciência e Tecnologia de Laticínios). 2002

NARIMATSU, A.; DORNELLAS, J.R.F.; SPADOTI, L.M.; PIZAIA, P.D.; ROIG, S.M. Avaliação da proteólise e do derretimento do queijo prato obtido por ultrafiltração. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v.23, (supl), p. 177-182, 2003.

NASSER, G. V.; EVANGELISTA V. L., MARTINS, C. F.; FERNANDES, B.R., BOTREL, A. D. A microbiological and physical-chemical based evaluation of artisanal Minas cheese production in Rio Paranaíba city, Minas Gerais, Brazil. **Revista Acadêmica Ciência Animal**, 14, 47 – 56, 2015.

NASSU, R. T; MOREIRA, C. G.; ROCHA, R. G. A.; FEITOSA, T.; BORGES, M. F.; MACEDO, A. A. M. Diagnóstico das condições de processamento e qualidade microbiológica de produtos regionais derivados do leite produzidos no estado do Rio Grande do Norte. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, v. 55, p. 121-126, 2000.

NOGUEIRA, M.C.L. Nogueira, G. Lubachevsky, S.A. Rankin A study of the volatile composition of Minas cheese LWT - **Food Science Technology**., 38, pp. 555-563. 2005.

OKURA, M. H. **Avaliação microbiológica de queijos tipo minas comercializados na região do triângulo mineiro**. 2010. 146p. Tese (Doutorado em Microbiologia Agropecuária) – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinária – Jaboticabal.

OLIVEIRA, D. F.; CRIVELLARI, M. A.; PORTO, M. A. C.; BRAVO, C. E. C.; TONIAL, I. B. Caracterização físico-química de queijos Minas artesanal produzidos em diferentes microrregiões de minas gerais. **Revista Brasileira de Economia Doméstica**, v. 24, n. 2, p. 185-196, 2013

OLIVEIRA, L.J. **Caracterização Microbiológica e Físico-Química Durante a Maturação em diferentes épocas do ano de queijo Minas Artesanal de produtores cadastrados da mesorregião de Campo das Vertentes – MG**. 2014. 111 f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2014

ORDÓÑEZ, J.A. **Tecnologia de Alimentos**. Alimentos de origem animal. 1. ed. Porto Alegre: Artmed, v.2, 2005.

ORNELAS, E.A.; CERQUEIRA, M.M.O. P; SILVA; M.C.C.; DIAS, R.S. Perfil enterotoxigênico de amostras de queijo Minas artesanal produzidas na Serra da Canastra-MG. **Período Científico do Núcleo de Biociências Centro Universitário Metodista Izabela Hendrix**, Belo Horizonte, MG, v.02, n.04, Dez de 2012.

PAULSON, J. N., STINE, O. C., BRAVO, H. C., POP, M. Differential abundance analysis for microbial marker-gene surveys. **Nature Methods**, 10(12), 1200–1202, 2013.

PELISSER, M. R.; KLEIN, C. S.; ASCOLI, K. R.; ZOTTI, T.R.; ARISIL, A. C. M. Occurrence of *Staphylococcus aureus* and multiplex PCR detection of classic enterotoxin genes in cheese and meat products. **Brazilian Journal Microbiology**. v. 40, p. 145-148, 2009.

PEREIRA, R. B. **Caracterização microbiológica de alguns tipos de queijos regionais brasileiros**. 31f. Monografia (Conclusão do curso), Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas. Belo Horizonte. 2007.

PERIN, L. M.; SARDARO, M. L. S.; NERO, L. A.; NEVIANI, E. N.; GATTI, M. Bacterial ecology of artisanal Minas cheese assessed by culture-dependent and – independent methods. **Food Microbiology**, v.65, p.160-169, 2017.

PEROTTI, M. C.; BERNAL, S. M.; MEINARDI, C. A.; CANDIOTI, M. C.; ZALAZAR, C. A. Substitution of natural whey starter by mixed strains of *Lactobacillus helveticus* in the production of Reggianito Argentinian Cheese. **International Journal of Dairy Technology**, Huntingdon, v.57, n.01, p. 45-51, 2004.

PERRY, K. S. P. Queijos: aspectos químicos, bioquímicos e microbiológicos. **Química Nova**, São Paulo, v. 27, n. 02, p. 293-300, 2004.

PINCHUK, I. V., BESWICK, E. J., & REYES, V. E. Staphylococcal enterotoxins. **Toxins**, 2(8), 2177–2197, 2010.

PINTO, M.S.; PINTO, A.F.; DE CARVALHO, A.C.D.S.; PIRES, J.C.J.; DE AULA D. SOBRAL, F.A.R. MAGALHÃES. Survival of *Listeria innocua* in Minas traditional Serro cheese during ripening. **Food Control**, 20 pp. 1167-1170 2009

PINTO, M. S.; LEMPK, M. W.; CABRINI, C. C.; SARAIVA, L. K. V.; CRUZ CANGUSSU, R. R.; CUNHA, A. L. F. S. Características físico-químicas e microbiológicas do queijo artesanal produzido na microrregião de Montes Claros–MG. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, v. 71, n. 1, p. 43-52, 2016.

PONTAROLO, G.H.; MELO, F. D.; MARTINI, C. L.; WILDEMANN, P.; ALESSIO, D. R. M.; SFACIOTTE, R. A. P.; NETO, A. T.; VAZ, E. K.; FERRAZ, S. M. Quality and safety of artisan cheese produced in the serrana region of Santa Catarina. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 38, n. 2, p. 739-748, 2017.

RAFAEL, V. C. Phenotypes of the predominant microflora of the endogenous ferment (pingo) relevant to the characteristics and microbiological safety of artisanal Minas cheese of Serra da Canastra. Universidade Federal de Viçosa. 2017.

RAMPELOTTO, P. H., SEREIA, A. F. R., DE OLIVEIRA, L. F. V., MARGIS, R. Exploring the hospital microbiome by high-resolution 16S rRNA profiling. **International Journal of Molecular Sciences**, 20(12), 3099, 2019.

REIS, J. A.; HOFFMANN, P.; HOFFMANN, F. L. Ocorrência de bactérias aeróbias mesófilas, coliformes totais, fecais, e *Escherichia coli*, em amostras de águas minerais envasadas, comercializadas no município de São José do Rio Preto, SP.

**Revista Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 20, n. 145, p. 109-116, out. 2006.

RESENDE, E.C. **Aspectos sensoriais e microbiológicos do queijo minas artesanal da microrregião campo das vertentes**. Dissertação (Mestrado Profissional em Ciência e Tecnologia do Leite e Derivados). Juiz de Fora, MG: UFJF, 114 p. 2014.

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. 72p. Dissertação (Mestrado em Ciência animal). Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2010.

RESENDE, M. F. S., COSTA, H. H. S., ANDRADE, E. H. P., ACÚRCIO, L. B., DRUMMOND, A. F., CUNHA, A. F., SOUZA, M. R. Queijo de minas artesanal da Serra da Canastra: influência da altitude das queijarias nas populações de bactérias acidolacticas. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, 63, 1567–1573, 2011.

ROBINSON, R. K., WILBEY, R. A. **Fabricación de queso**. R. SCOTT. Editora ACRIBIA, S.A. 2ª ed. 488p. 2002.

SALES, G. A. **Caracterização microbiológica e físico-química de queijo Minas artesanal da microrregião de Araxá-MG durante a maturação em diferentes épocas do ano**. 2015. 106 f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2015.

SANT'ANNA, F. M., WETZELS, S. U., CICCIO, S. H. S., FIGUEIREDO, R. C., SALES, G. A., FIGUEIREDO, N. C., ... SOUZA, M. R. Microbial shifts in Minas artisanal cheeses from the Serra do Salitre region of Minas Gerais, Brazil throughout ripening time. **Food Microbiology**, 82, 349–362, 2019.

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 (Mestrado em Produção Animal). Faculdade de Ciências Agrárias da Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri, Diamantina, 2010.

SHINOHARA, N. K. S.; BARROS, V. B.; JIMENEZ, S. M. C.; MACHADO, E. C. L.; DUTRA, R. A. F.; FILHO, J. L. L. *Salmonella* spp., importante agente patogênico veiculado em alimentos. **Ciência e saúde coletiva**, v.13, n.5, 2008.

SILVA, P. H. F., PINHEIRO, A. J. R., GOMES, J. C. PARREIRAS, J. F. M., MOSQUIM, M. C. A. V., FURTADO, M. M. Desenvolvimento de metodologia analítica para avaliação de proteólise em queijos. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**. Juiz de Fora. n. 295, v. 50. p. 15 - 29. 1995.

SILVA, J.G. **Características físicas, físico-químicas e sensoriais do queijo Minas artesanal da Canastra**. Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras. Lavras, 198p. 2007.



SILVA, N.; JUNQUEIRA, V. C. A.; SILVEIRA, N. F.; TANIWAKI, M. H.; SANTOS, R. F.S.; GOMES, R. A. R.; OKAZAKI, M. M. **Manual de Métodos de Análises Microbiológicas de Alimentos**. 3. ed. São Paulo- Sp: Livraria Varela Ltda., 2007.

SILVA, N.; JUNQUEIRA, V. C. A.; SILVEIRA, N. F. A. **Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos e água**. 4ª edição. São Paulo: Varela, 2010. 624 p.

SILVA, L. C. C.; BELOTI, V.; TAMANINI, R.; D'OVIDIO, L.; MATTOS, M. R.; ARRUDA, A. M. C. T.; PIRES, E. M. F. Rastreamento de fontes da contaminação microbiológica do leite cru durante a ordenha em propriedades leiteiras do Agreste Pernambucano. **Seminário: Ciências Agrárias**, v. 32, n. 1, p. 267-276, 2011.

SOARES, D. B. **Caracterização físico-química e microbiológica do queijo minas artesanal da região de Uberlândia-MG**. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias). Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia. 2014, 124f.

SOBRAL, D.; COSTA, R. G. B.; JACINTO DE PAULA, J. C.; TEODORO, V. A. M.; GISELA DE MAGALHÃES MACHADO MOREIRA, G. M. M.; PINTO, M. S. Principais defeitos em queijo Minas artesanal: Uma Revisão. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, v. 72, n. 2, p. 108-120, 2017.

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**, Canoas, v. 5, n. 2, p. 25-42, 2011.

TABLA, R., GOMEZ, A., SIMANCAS, A., REBOLLO, J. E., MOLINA, F., & ROA, I. Enterobacteriaceae species during manufacturing and ripening of semi-hard and soft raw ewe's milk cheese: Gas production capacity. **Small Ruminant Research**, 145, 123–129, 2016.

UPADHYAY, V.K.; McSWEENEY, P.L.H.; MAGBOUL, A.A.A.; FOX, P.F. **Proteolysis in Cheese during Ripening**. London: Elsevier, v.1, (3 ed). p. 391-434, 2004.

VANETTI, M.C.D.; PINTO, U.M. Bactérias patogênicas em leite e produtos lácteos. p. 181-206. In: Pinto et al. Qualidade Microbiológica do leite cru. Viçosa, MG: EPAMIG, 2013. 272p.

VICOSA GN, MORAES PM, YAMAZI AK, NERO LA. Enumeration of coagulase and thermonuclease-positive *Staphylococcus* spp. in raw milk and fresh soft cheese: An evaluation of Baird-Parker agar, rabbit plasma fibrinogen agar and the Petrifilm™ Staph Express count system. **Food Microbiology**. 2010;27:447–452, 2010.

VISSER, S. Proteolytic enzymes and their relation to cheese ripening and flavor: An overview. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 76, n. 1, p. 329-350, 1993.

VANDERHAEGHEN, W., HERMANS, K., HAESEBROUCK, F., & BUTAYE, P. (2010). Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in food production animals. **Epidemiology and Infection**, 138(5), 606–625.

WANG, Y., QIAN, P.Y. Conservative fragments in bacterial 16S rRNA genes and primer design for 16S ribosomal DNA amplicons in metagenomic studies. **Plos One**, 4 (10), e7401, 2009.

WEHR, H. M.; FRANK, J. F. In: **American Public Health Association**. 17th ed. Washington, 2004.

WOUTERS, J.T.M., AYAD, E.H.E., HUGENHOLTZ, J., SMIT, G. Microbes from raw milk for fermented dairy products. **International Dairy Journal**, 12, 91–109. 2002.

WOLFSCHOON-POMBO, A. F., LIMA, A. Extensão e profundidade de proteólise em Queijo Minas Frescal. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**. Juiz de Fora. 44, (261-266); 50-54. 1989.

ZADOKS, R. N., MIDDLETON, J. R., MCDUGALL, S., KATHOLM, J., & SCHUKKEN, Y. H. (2011). Molecular epidemiology of mastitis pathogens of dairy cattle and comparative relevance to humans. **Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia**, 16(4), 357–372.

## APENDICE A

### PROJETO DE PESQUISA

**Título:** Educação e Segurança de Alimentos para Produção de Queijo Minas Artesanal da Região das Entre Serras.

#### QUESTIONÁRIO PARA ENTREVISTA – COLETA DE DADOS

Responsável pela entrevista: \_\_\_\_\_ Entrevista Nº \_\_\_\_\_

Entrevistado: \_\_\_\_\_ Assinatura: \_\_\_\_\_

Empresa: \_\_\_\_\_

Nome fantasia: \_\_\_\_\_

Nome do proprietário: \_\_\_\_\_

Município: \_\_\_\_\_  Zona rural  Zona urbana

e-mail: \_\_\_\_\_ Site: \_\_\_\_\_

CNPJ da empresa: \_\_\_\_\_ Inscrição Estadual: \_\_\_\_\_

Data: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

Início: \_\_\_\_\_ h Término: \_\_\_\_\_ h

<b>PARTE I – IDENTIFICAÇÃO DA UNIDADE DE ANÁLISE</b>
--

**1. Idade do proprietário**

- até 20 anos                       de 21 a 30 anos                       de 31 a 40 anos  
 de 51 a 60 anos                       mais de 61 anos

**2. Grau de escolaridade?**

- Pós-graduação                       Superior completo                       Segundo grau  
 Primeiro grau                       Primário

**3. Tempo de experiência na atividade – produção e comercialização de queijo artesanal?**

- Menos de 01 ano     de 01 a 05 anos     de 06 a 10 anos     Acima de 10 anos

**4. Qual é o número de funcionários/pessoas envolvidas na elaboração dos queijos?** \_\_\_\_\_

**5. Qual o volume de leite utilizado na fabricação do queijo por dia?**

\_\_\_\_\_

**6. O queijo elaborado possui algum selo de inspeção (SIM – Serviço de Inspeção Municipal, por exemplo)?**

<b>ÁREA DE PRODUÇÃO</b>
-------------------------

**7. Qual a origem do leite utilizado na elaboração do queijo?**

- Produção própria                       Comprado de terceiros                       Ambas

8. Quais as condições físicas e higiênico-sanitárias de produção do leite? Especificar as condições.

9. Quais os equipamentos/utensílios utilizados na fabricação do queijo?

De qual (is) material (ias)? \_\_\_\_\_

10. É adicionado algum ingrediente durante a elaboração do queijo? Quais?

- A quantidade é controlada                       Em vasilhame específico  
 A temperatura é controlada                       Não há nenhum tipo de controle

11. Quais as condições higiênicas do ambiente de produção e utensílios/equipamentos?

- Em boas condições de higiene                       Frequência de higienização \_\_\_\_\_.  
 Em condições insatisfatórias de higiene. Descrever as condições:

---



---



---

12. Quais as etapas de elaboração do queijo? Adicionar as condições (como tempo, temperatura, quantidade de ingredientes, dentre outros) relacionadas a cada etapa.

- a.  
b.  
c.

13. Qual a temperatura de armazenamento dos queijos? E por quanto tempo?

Temperatura ambiente: \_\_\_\_\_

Tempo: \_\_\_\_\_.

Outras informações importantes: \_\_\_\_\_

14. Quem é o responsável pela elaboração do queijo?

- Sempre a mesma pessoa  
 Não existe alguém específico para desenvolver esta atividade

15. Os funcionários utilizam uniforme durante a manipulação dos produtos?

- Roupas brancas                       Gorro  
 Botas                       Outros: \_\_\_\_\_

16. Há conscientização das pessoas envolvidas na produção com relação às condições higiênicas dos manipuladores?

- Não  
 Sim

17. Se a resposta for SIM, com relação a que pontos existe o controle?

- Barbas                       Cabelos  
 Unhas                       Roupas (Uniformes) Outros: \_\_\_\_\_

18. Que produtos são utilizados nos processos de higienização?

- Detergentes                       Desinfetantes  
 Outros

Identificar os principais produtos utilizados:

---

19. Os equipamentos são higienizados logo após a produção?

- Sim                       Não

20. Os equipamentos são higienizados e/ou desinfetados antes do início da produção?

- Sim                       Não

Como? \_\_\_\_\_.

**21. Qual a origem da água utilizada na área de processamento?**

- Poço artesiano  
 Outro. Qual? \_\_\_\_\_.

**22. Qual o destino do soro?**

- Alimentação animal  Descarte  
 Soro-fermento

**23. Qual o estado de conservação das instalações?**

1. Piso  
2. Paredes  
4. Telas milimetradas  
5. Teto  
6. Telas milimetradas

**Em bom estado**

**Necessita reforma**