

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos
Departamento de Alimentos e Nutrição Experimental

Avaliação microbiológica de queijos minas artesanais
provenientes da Serra da Canastra durante e após o período
de maturação

Gabriela Zampieri Campos

Dissertação para obtenção do Título de Mestre

Orientador: Prof. Dr. Uelinton Manoel Pinto

São Paulo
2019

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos
Departamento de Alimentos e Nutrição Experimental
Área de Bromatologia

Avaliação microbiológica de queijos minas artesanais
provenientes da Serra da Canastra durante e após o período
de maturação

Gabriela Zampieri Campos

Versão corrigida da Dissertação conforme resolução CoPGr 6018.

Dissertação para obtenção do Título de Mestre

Orientador: Prof. Dr. Uelinton Manoel Pinto

São Paulo
2019

Ficha Catalográfica elaborada eletronicamente pelo autor, utilizando o programa desenvolvido pela Seção Técnica de Informática do ICMC/USP e adaptado para a Divisão de Biblioteca e Documentação do Conjunto das Químicas da USP

Bibliotecária responsável pela orientação de catalogação da publicação:
Marlene Aparecida Vieira - CRB - 8/5562

C198a Campos, Gabriela Zampieri
Avaliação microbiológica de queijos minas artesanais provenientes da Serra da Canastra durante e após o período de maturação / Gabriela Zampieri Campos. - São Paulo, 2019.
89 p.

Dissertação (mestrado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo.
Departamento de Alimentos e Nutrição Experimental.
Orientador: Pinto, Uelinton Manoel

1. Queijo minas artesanal da Canastra. 2. Segurança de alimentos. 3. Patógenos alimentares. 4. Micro-organismos indicadores. I. T. II. Pinto, Uelinton Manoel, orientador.

Gabriela Zampieri Campos

Avaliação microbiológica de queijos minas artesanais
provenientes da Serra da Canastra durante e após o período
de maturação

Comissão Julgadora
da
Dissertação para obtenção do Título de Mestre

Prof. Dr.
orientador/presidente

1o. examinador

2o. examinador

3o. examinador

4o. examinador

São Paulo, _____ de _____ de 2019

AGRADECIMENTOS

Primeiramente o meu agradecimento é a Deus pela saúde, força e sabedoria para batalhar e nunca desistir diante de todos os desafios dessa fase.

Ao meu orientador Uelinton M. Pinto pela oportunidade, confiança, ajuda, dedicação, paciência, aprendizado e por contribuir para tornar esse sonho possível.

Aos membros da banca julgadora composta por Bernadette D. G. M. Franco, Evelise Oliveira Telles, Leo Kunigk e ao presidente da banca Thomas Prates Ong pelas contribuições para o enriquecimento do trabalho.

Às professoras Mariza Landgraf e Bernadette Franco pela oportunidade de aprendizagem na disciplina ministrada por elas ao qual fui monitora e por todos os ensinamentos em sala de aula durante a pós-graduação.

À Katia Leani e dona Lúcia, funcionárias do laboratório de microbiologia, pela ajuda, paciência e ensinamentos.

Aos meus companheiros de pesquisa Raquel Oliveira, Ana Paulina Arellano, Thamires Guarneri (iniciação científica), Gustavo Lacorte, Luciano Queiroz e Wiliam Isidoro por toda a ajuda dentro e fora do laboratório.

Aos amigos que fiz durante essa jornada e levarei para sempre comigo: Ana Clara Candelaria, Carlos Tersarotto, Débora Oliveira e Marcelo Belchior. Deixaram minha rotina mais feliz e leve.

A todos os colegas do laboratório de microbiologia pela amizade.

Aos produtores de queijo da Serra da Canastra e a Associação dos Produtores de Queijo da Serra da Canastra (APROCAN) que aceitaram participar dessa pesquisa. À Gabriela Almeida, veterinária da APROCAN, pela disponibilidade me recebendo durante alguns dias em sua casa para realização do estudo *in loco* e pela ajuda.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pois o presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

Ao FORC (Food Research Center) e Fundação de Amparo à Pesquisa de São Paulo (FAPESP) pela contribuição financeira para o desenvolvimento deste projeto e ajuda de custo para apresentação do trabalho em congressos científicos.

À todos professores da USP com os quais tive oportunidade de adquirir conhecimento através de disciplinas, palestras, workshops.

A todos os funcionários da FCF/USP por toda a ajuda.

Ao meu marido Guilherme, que desde o início me apoiou, me incentivou, teve paciência, compreensão, companheirismo e amor. Aos meus pais Shyrlei e Antônio, que nunca pouparam esforços para me ajudar, sempre estiveram presentes, mesmo a 400 km de distância, e que foram meus maiores motivadores.

Agradeço também ao meu cunhado Vitor, sogra Rute e sogro Wagner que também sempre estiveram presentes e me motivando.

RESUMO

CAMPOS, G. Z. **Avaliação microbiológica de queijos minas artesanais provenientes da Serra da Canastra durante e após o período de maturação.** 2019. 90p. Dissertação (Mestrado). Programa de Pós-graduação em Ciência dos Alimentos. Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, SP, 2019.

O queijo minas artesanal da Canastra é produzido na região da Serra da Canastra por pequenos produtores, sendo que alguns são cadastrados no Programa Queijo Minas Artesanal (PQMA) do Instituto Mineiro de Agropecuária (IMA). 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 de 22 dias. Este trabalho avaliou as características microbiológicas de queijos obtidos de 78 produtores rurais da região da Canastra após a maturação e de três produtores rurais durante maturação. As contagens de coliformes totais, *Escherichia coli* e *Staphylococcus coagulase positiva* foram realizadas em placas Petrifilm® (3M). A detecção de *Salmonella* spp. foi realizada utilizando o método ISO 6579: 2002 e por PCR convencional e *Listeria monocytogenes* foi investigada de acordo com o método ISO 11290-1:1996/(A) 1: 2004 e PCR convencional. A contagem de Enterobacteriaceae foi determinada pelo método APHA 9.62: 2015. As mensurações de pH foram realizadas de acordo com o método IAL 017/IV em pHmetro digital BEL *engineering* e aferidas diretamente com pHmetro Hanna Instruments e a atividade de água (a_w) em analisador Aqua Lab. No estudo realizado ao longo da maturação, as análises indicaram que as amostras, todas provenientes de produtores cadastrados no PQMA, atingiram os limites estabelecidos pela legislação antes dos 22 dias de maturação. Houve diferença significativa ($p < 0,05$) no pH das amostras ao longo da maturação, embora este parâmetro não tenha correlação com as contagens analisadas. Já no estudo pós maturação, os resultados mostraram que 54% das amostras dos produtores cadastradas e 65% das amostras dos produtores não cadastradas no PQMA não atenderam a pelo menos um parâmetro microbiológico exigido pela legislação. As contagens obtidas para Enterobacteriaceae variaram de <1 a 6,6 log UFC/g, para coliformes totais de <1 a 6,4 log UFC/g, *E. coli* de <1 a 5,8 log UFC/g e *Staphylococcus coagulase positiva* de <1 a 7,6 log UFC/g. Em nenhuma amostra foi encontrada *Salmonella* spp e *L. monocytogenes* foi detectada e confirmada por PCR em uma amostra analisada. Os valores obtidos de pH e a_w estratificados em grupos que atendem e não atendem a legislação não mostraram diferença significativa, sugerindo que esses parâmetros não são bons indicadores de qualidade microbiológica do produto. O elevado número de não-conformidades indica que são necessários esforços para melhoria das condições higiênico-sanitárias refletidas por meio dos indicadores microbiológicos. O registro no PQMA mostrou-se efetivo durante o estudo da maturação, mas não teve o mesmo resultado no estudo mais abrangente realizado pós maturação. São necessários mais esforços dos produtores (cadastrados e não cadastrados) bem como dos órgãos reguladores para melhoria dos indicadores microbiológicos.

Palavras chave: Queijo minas artesanal da Canastra; segurança de alimentos; patógenos alimentares; micro-organismos indicadores.

ABSTRACT

CAMPOS, G. Z. **Microbiological evaluation of artisanal minas cheeses from Serra da Canastra during and after the ripening period.** 2019. 90p. Dissertation (Master Degree). Graduate Program in Food Science, Faculty of Pharmaceutical Sciences, University of Sao Paulo, SP, Brazil, 2019.

Canastra artisanal minas cheese is produced in the *Serra da Canastra* region by small farmers who may or may not be registered in the Artisanal Minas Cheese Program (PQMA) of the Agricultural Institute of Minas Gerais (IMA). Since this cheese is made from raw milk, it is important that the pathogens that may be carried in this product are controlled during the 22 days of ripening. This work evaluated the microbiological characteristics of cheese samples from 78 rural properties in the Canastra region after the ripening period and during ripening in three rural properties. Total coliform counts, *Escherichia coli* and *Staphylococcus* coagulase positive were performed on Petrifilm® plates (3M). The detection of *Salmonella* spp. was performed using the ISO 6579: 2002 method and conventional PCR and *Listeria monocytogenes* was investigated according to ISO 11290-1: 1996/(A) 1: 2004 and conventional PCR. The Enterobacteriaceae count was determined by the APHA method 9.62: 2015. The pH analyzes were performed according to the IAL 017/IV method on a BEL engineering digital pHmeter and measuring directly with Hanna Instruments pHmeter and the water activity (a_w) in Aqua Lab analyzer. In the study carried out during ripening, the analyzes indicated that the samples, all from properties registered in the PQMA, reached the limits established by the legislation before the 22 days of ripening. There was a significant difference ($p < 0.05$) in the pH of the samples during ripening, even though this parameter did not correlate with the microbiological counts. In the post-ripening study, the results showed that 54% of samples from PQMA registered properties and 65% of samples from non-registered properties did not comply with at least one microbiological parameter required by the legislation. Enterobacteriaceae counts ranged from <1 to 6.6 log CFU/g, for total coliforms from <1 to 6.4 log CFU/g, *E. coli* from <1 to 5.8 log CFU/g and *Staphylococcus* coagulase positive from <1 to 7.6 log CFU/g. *Salmonella* spp. was not detected and *L. monocytogenes* was detected and confirmed by conventional methodology and by PCR in one analyzed sample. The pH and a_w values stratified in groups that complied and did not comply with the legislation showed no significant difference, suggesting that these parameters are not good indicators of microbiological safety of the product. The high number of nonconformities indicates that efforts are needed to improve the hygiene and sanitary conditions reflected through the microbiological indicators. The PQMA registration was effective during the ripening study but did not have the same result in the larger post-ripening study. More efforts are needed from producers (registered and non-registered) as well as regulators to improve microbiological indicators of this cheese.

Keywords: Canastra artisanal minas cheese; food safety; foodborne pathogens; indicator micro-organisms.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Parâmetros microbiológicos para o queijo minas artesanal.	39
Tabela 2: Contagem de coliformes totais, <i>E. coli</i> e <i>Staphylococcus</i> coagulase positiva em log UFC/g ou mL e resultado do pH do leite, pingo, massa e queijo durante a maturação no produtor P1	48
Tabela 3: Contagem de coliformes totais, <i>E. coli</i> e <i>Staphylococcus</i> coagulase positiva em log UFC/g ou mL e resultado do pH do leite, pingo, massa e queijo durante a maturação no produtor P2.....	50
Tabela 4: Contagem de coliformes totais, <i>E. coli</i> e <i>Staphylococcus</i> coagulase positiva em log UFC/g ou mL e resultado do pH do leite, pingo, massa e queijo durante a maturação no produtor P3.....	52
Tabela 5: Quantidade de amostras de queijo minas artesanal da Canastra que atenderam ou não a legislação vigente, de acordo com os parâmetros microbiológicos exigidos.	60
Tabela 6: Valores obtidos de pH e a_w das amostras de queijo minas artesanal da Canastra.....	68

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: As sete regiões produtoras de queijo minas artesanal.....	16
Figura 2: Municípios produtores de queijo minas artesanal da Canastra.....	32
Figura 3: Etapas da produção de Queijo Minas Artesanal da Canastra.....	33
Figura 4: Queijo minas artesanal da Canastra maturando em prateleiras de madeira.	35
Figura 5: Variação do pH e das contagens dos micro-organismos na massa e queijo ao longo da maturação no produtor P1.....	49
Figura 6: Variação do pH e das contagens dos micro-organismos na massa e queijo ao longo da maturação no produtor P2.....	51
Figura 7: Variação do pH e das contagens dos micro-organismos na massa e queijo ao longo da maturação no produtor P3.....	53
Figura 8: Intervalo de contagens em log UFC/g dos micro-organismos analisados nas amostras de queijo minas artesanal da Canastra.....	62
Figura 9: Intervalo de contagens obtidas para cada micro-organismo de acordo com o cadastro no PQMA.....	63

LISTA DE QUADROS

Quadro 1: Histórico e evolução das legislações de queijos artesanais brasileiros aplicáveis ao produtor.	18
---	----

Sumário

1. INTRODUÇÃO	13
2. OBJETIVO.....	14
2.1. OBJETIVO GERAL	14
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	14
3. REVISÃO DA LITERATURA	14
3.1. QUEIJO MINAS ARTESANAL	14
3.2. EVOLUÇÃO DA LEGISLAÇÃO BRASILEIRA A RESPEITO DE QUEIJOS ARTESANAIS.....	17
3.3. MATURAÇÃO E CONTROLE DE PATÓGENOS.....	28
3.4. QUEIJO MINAS ARTESANAL DA CANASTRA	31
3.5. QUEIJO MINAS ARTESANAL DA CANASTRA, MICRO-ORGANISMOS INDICADORES DE SEGURANÇA E PATÓGENOS.....	36
4. MATERIAL E MÉTODOS	40
4.1. COLETA DAS AMOSTRAS.....	40
4.2. DETECÇÃO DE <i>Salmonella</i> spp.	41
4.2.1. MÉTODO CONVENCIONAL	41
4.2.2. MÉTODO MOLECULAR (PCR CONVENCIONAL)	42
4.3. DETECÇÃO DE <i>Listeria monocytogenes</i>	43
4.3.1 MÉTODO CONVENCIONAL	43
4.3.2. MÉTODO MOLECULAR (PCR CONVENCIONAL)	44
4.4. ENUMERAÇÃO DE Enterobacteriaceae.....	45
4.5. ENUMERAÇÃO DE COLIFORMES TOTAIS E <i>Escherichia coli</i>	45
4.6. ENUMERAÇÃO DE <i>Staphylococcus coagulase positiva</i>	46
4.6.1. TESTE DE COAGULASE POSITIVA	46
4.7. AFERIÇÃO DO pH	47
4.8. AFERIÇÃO DA ATIVIDADE DE ÁGUA (a_w)	47
4.9. ANÁLISE ESTATÍSTICA	47
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	47
5.1. ESTUDO LONGITUDINAL	47
5.2. ESTUDO TRANSVERSAL	59
6. CONCLUSÕES	70
REFERÊNCIAS	70

1. INTRODUÇÃO

O queijo minas artesanal 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 da Serra da Estrela em 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.

Entre os tipos de queijos artesanais mineiros, destaca-se o queijo da Canastra, que é um queijo do tipo semi-duro, de média umidade e maturado, produzido na região da Serra da Canastra, localizada no estado de Minas Gerais. Em seu preparo é utilizado leite cru, ou seja, sem tratamento térmico, e um fermento endógeno chamado “pingo” ou “soro-fermento”, originário da etapa de dessoramento do queijo do dia anterior e utilizado para a fermentação do produto diariamente. Os produtores desse alimento geralmente são agricultores que podem ou não estar cadastrados no Programa do Queijo Minas Artesanal (PQMA) do Instituto Mineiro de Agropecuária (IMA), o que possibilitava, até 2018, a venda legal desse produto dentro do estado de Minas Gerais (MINAS GERAIS, 2012).

O período de maturação do queijo minas artesanal 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 oxidação, bem como a competição por nutrientes pelos micro-organismos, controlam o crescimento e composição da microbiota de queijo. Além disso, durante o período de maturação, ocorre produção de peróxido de hidrogênio, dióxido de carbono, acetaldeído, diacetil e bacteriocinas por bactérias do ácido láctico, o que também contribui para o controle de patógenos (McSWEENEY et al., 2017).

O uso do leite cru é um fator de risco para a segurança do produto e, portanto, é importante que os patógenos que podem ser veiculados por esta matéria prima sejam controlados durante e após o período mínimo de maturação.

2. OBJETIVO

2.1. OBJETIVO GERAL

Avaliar os indicadores de higiene e segurança microbiológica, focado nas bactérias da família Enterobacteriaceae, coliformes totais, *Escherichia coli*, *Staphylococcus coagulase positiva*, *Salmonella* e *Listeria monocytogenes*, bem como aspectos físico-químicos, como pH e atividade de água, do queijo minas artesanal da Canastra durante e após o período de maturação.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ✓ Avaliar e comparar com a legislação vigente os indicadores de higiene, segurança microbiológica e características físico-químicas de queijo minas artesanal da Canastra provenientes de produtores cadastrados no PQMA, no decorrer da maturação;
- ✓ Avaliar e comparar com a legislação vigente os indicadores de higiene, segurança microbiológica e características físico-químicas de queijo minas artesanal da Canastra, após o período de maturação, em amostras provenientes de produtores cadastrados e não cadastrados no PQMA;
- ✓ Avaliar a relação entre as características físico-químicas e as contagens dos indicadores e a presença de patógenos;
- ✓ Coletar dados microbiológicos para possível revisão da legislação para queijo minas artesanal.

3. REVISÃO DA LITERATURA

3.1. QUEIJO MINAS ARTESANAL

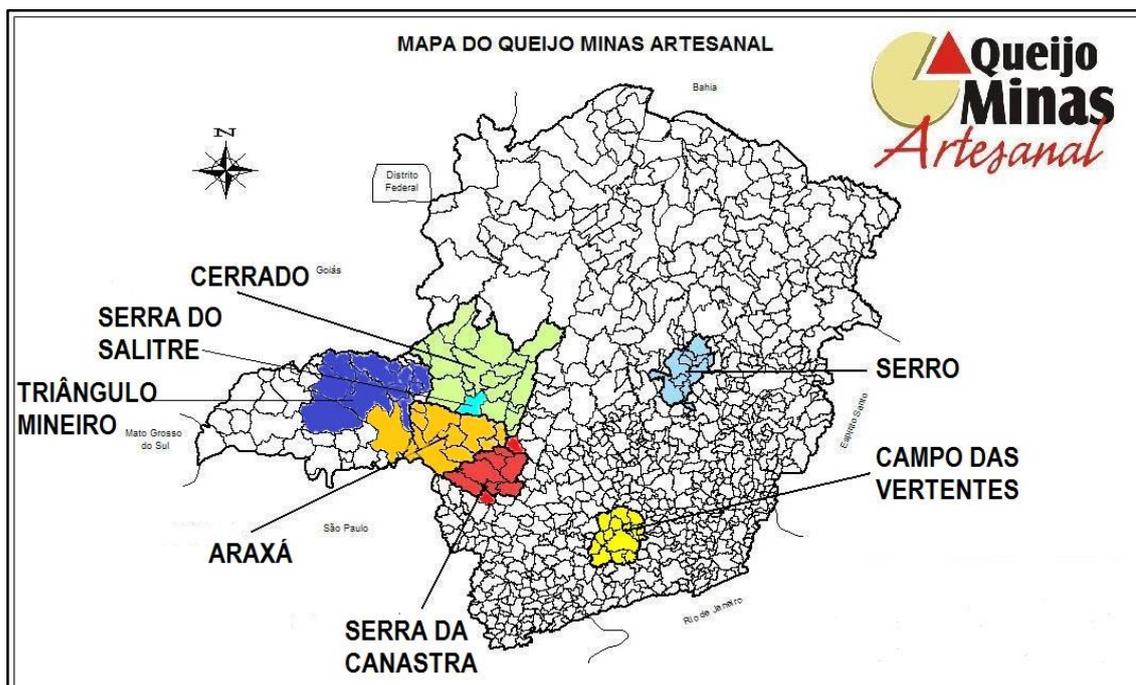
Dados de 2015 indicam que a produção de leite voltada a fabricação de queijo no Brasil foi de 11 bilhões de litros, o que equivale a quase metade da produção do leite no país. No ano de 2017 foram produzidas mais de um milhão de toneladas de queijo em todo o território nacional, sendo o consumo desse produto de aproximadamente 5,5 quilos por habitante, por ano (ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE

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 queijo minas artesanal 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 queijo minas artesanal “o queijo elaborado com leite integral fresco e cru e com características de identidade e qualidade específicas (MINAS GERAIS, 2018). O queijo minas artesanal é um tipo de queijo semi-duro, sendo o valor de sua umidade em base úmida de até 45,9% (MINAS GERAIS, 2008).

O queijo minas artesanal é produzido em sete regiões de Minas Gerais (Figura 1), com certificação de origem: Campo das Vertentes, Araxá, Canastra, Cerrado, Serro, Serra do Salitre e Triângulo Mineiro (IMA, 2018). 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 queijo minas artesanal e estão localizados nas sete 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).

Figura 1: As sete regiões produtoras de queijo Minas artesanal.



Fonte: EMATER, 2004.

No ano de 2002, o governo do estado de Minas Gerais, com o apoio da EMATER-MG e IMA, criou o Programa Queijo Minas Artesanal (PQMA). Esse programa tem como objetivo contemplar a “organização e padronização dos produtores, padronização de produtos, normatização de processos de produtos, normatização de processos de produção, embalagens, comercialização e certificação da origem e qualidade de seus queijos” (EMATER, 2002).

O cadastro e registro dos produtores são de responsabilidade do IMA, órgão estadual credenciado junto ao Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), ao qual realiza as inspeções sanitárias das queijarias. Dentre as responsabilidades da queijaria cadastrada, pode-se citar o certificado de conclusão do curso de boas práticas de ordenha (BPO) e de fabricação (BPF) pelos manipuladores; manual de boas práticas de ordenha e de fabricação; exame microbiológico e físico-químico da água de abastecimento; exame microbiológico e físico-químico do queijo, conforme parâmetros estabelecidos pelo serviço de inspeção; e exame negativo de brucelose e tuberculose de todos os animais. A EMATER-MG auxilia aos produtores com programas de assistência técnica, como, por exemplo, cursos de boas práticas de fabricação, programas de concessão de créditos, facilitando assim a concessão do cadastro no programa.

Entre as práticas adotadas pelas queijarias cadastradas no PQMA como controle de BPO e BPF estão: controle diário da Potabilidade da água (mensuração do nível de cloro e pH); acidez do leite e do fermento endógeno (pingo), bem como a mensuração da temperatura e umidade da queijaria; registros de limpezas da sala de ordenha (higienização dos úberes e tetos dos animais antes (*pré-dipping*) e após (*pós-dipping*) a ordenha, teste da caneca de fundo preto, limpeza do equipamento de ordenha, lavagem do chão, limpeza de dejetos, troca/calibragem de equipamentos) e queijaria (higienização dos funcionários, higienização dos utensílios, bancas, armários, prateleiras, pia); rastreabilidade/controle de produção (tipo de queijo produzido, quantidade produzida, data de saída, local de expedição). Como controle semanal são feitos os testes de Alizarol e teste de CMT (*California Mastitis Test*) e semestralmente são realizadas as limpezas de reservatórios de água. O controle de pragas é feito sempre que a queijaria necessitar.

Vale ressaltar que queijaria cadastrada é “o estabelecimento rural que elabora o produto e comercializa-o no estado de Minas Gerais”; queijaria relacionada é “o estabelecimento rural que elabora o queijo e está vinculada a um Entrepasto”; Entrepasto registrado é “o estabelecimento que recebe, matura, classifica e embala o queijo e comercializa o produto em todo território devido ao registro no Sistema Brasileiro de Inspeção de Produtos de Origem Animal (SISBI-POA)” e queijaria registrada é “o estabelecimento rural que elabora o queijo, com maturação prevista na legislação, e comercializa o produto nacionalmente devido ao registro no SISBI” (IMA, 2018). Até o ano de 2017, existiam 254 queijarias cadastradas no PQMA e apenas cinco dessas queijarias e dois entrepostos eram registrados no SISBI (IMA, 2017).

3.2. EVOLUÇÃO DA LEGISLAÇÃO BRASILEIRA A RESPEITO DE QUEIJOS ARTESANAIS

A Lei 1.283 de 1950 (BRASIL, 1950) e o Decreto Lei 30.691 de 1952 (BRASIL, 1952) tiveram por objetivo a criação da obrigatoriedade de fiscalização industrial e sanitária de produtos de origem animal, visando tornar a produção desses alimentos mais homogênea, frente a segurança dos alimentos e a própria maneira de produção industrial. 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). Logo, os produtos artesanais e industriais eram fiscalizados e inspecionados da mesma forma. Este descompasse gerou para a maioria dos produtores artesanais uma dificuldade para comercialização de seus produtos, já que a quantidade, o modo de produção e controle de qualidade para adequação aos parâmetros exigidos por lei distanciam-se enormemente do modo de produção industrial.

Os produtores de queijo artesanal fazem parte dos que buscam pela heterogeneidade da legislação, visto que, assim como os demais produtos artesanais, 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, uma ação contínua pela adequação da legislação para esses produtores, com criação de novas regulamentações específicas para os queijos produzidos de maneira artesanal em todo o território brasileiro vem acontecendo, como pode ser visto no Quadro 1.

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

Legislação	Origem	Pontos relevantes
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.

		<p>Selo SIF – Serviço de Inspeção Federal – comercialização entre estados.</p> <p>Queijo “minas” padrão - obtido de leite integral ou padronizado, pasteurizado, de massa crua, prensado mecanicamente e devidamente maturado durante 20 (vinte) dias.</p>
Lei 7.889, de 13 de novembro de 1989	Federal	<p>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.</p> <p>Secretarias ou Departamentos de Agricultura dos Municípios fiscalizam comércio municipal.</p>
Portaria 146, de 7 de março de 1996	Federal	<p>Regulamentos Técnicos de Identidade e Qualidade dos Produtos Lácteos.</p> <p>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.</p>
Resolução 07, de 28 de novembro de 2000	Federal	Oficializa os critérios de funcionamento e de controle da

		<p>produção de Queijarias, para seu relacionamento junto ao SIF.</p> <p>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.</p>
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.

Portaria ADEPARA 418, de 26 de fevereiro de 2013	Pará	Regulamento Técnico para a produção do Queijo do Marajó (Pará). Características sensoriais, físico-químicas, microbiológicas, produção e comercialização.
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 beneficiamento artesanais de leite de cabra e de ovelha e de seus derivados. Produtor deve ser cadastrado no IMA.
Instrução Normativa SEAGRI 7, de 09 de dezembro de 2014	Rio Grande do Sul	Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade do queijo Serrano. Características sensoriais, físico-químicas e microbiológicas.
Lei 14.973, de 29 de dezembro de 2016	Rio Grande do Sul	Produção e a comercialização do queijo artesanal Serrano no Estado do Rio Grande do Sul.
Decreto 9.013, de 29 de março de 2017	Federal	Revoga o Decreto Lei 30.691 de 29 de março de 1952. Novo RIISPOA.
Decreto 1238, de 19 de julho de 2017	Santa Catarina	Produção e a comercialização do queijo artesanal Serrano no Estado de Santa Catarina.
Portaria IMA 1736, de 27 de julho de 2017	Minas Gerais	Altera a Portaria 1305 de 2013, de 30 de abril de 2013, que dispõe sobre o período de maturação do Queijo Minas Artesanal. 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.
Lei 10.230, de 07 de agosto de 2017	Rio Grande do Norte	Produção e a comercialização de queijos e manteiga artesanais no Estado do Rio Grande do Norte.
Lei 17.486, de 16 de janeiro de 2018	Santa Catarina	Produção e comercialização de queijos artesanais de leite cru no estado de Santa Catarina.
Lei 13.680, de 14 de junho de 2018	Federal	Selo ARTE. Permitida a comercialização interestadual de produtos alimentícios produzidos de forma artesanal. Submetidos à fiscalização de órgãos de saúde pública dos Estados e do Distrito Federal. Inspeção e a fiscalização de natureza orientadora.
Decreto 28.012 de 30 de maio de 2018	Rio Grande do Norte	Altera o Decreto Estadual nº 27.683, de 26 de janeiro de 2018, que regulamentou a Lei Estadual nº 10.230, de 7 de agosto de 2017, que trata da produção e da comercialização de queijos e manteiga artesanais do Rio Grande do Norte - Lei Nivardo Mello.
Decreto 54.199, de 24 de agosto de 2018	Rio Grande do Sul	Regulamenta a Lei 14.973, de 29 de dezembro de 2016, que dispõe sobre a produção e a comercialização do queijo

		artesanal serrano no Estado do Rio Grande do Sul.
Lei nº 23157 de 18 de dezembro de 2018.	Minas Gerais	Dispõe sobre a produção e a comercialização dos queijos artesanais de Minas Gerais.
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 artesanal na implantação dos programas de boas práticas agropecuárias de produção leiteira e de fabricação do queijo artesanal.</p>
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 artesanais; Requisitos para ser um produto artesanal; Fiscalização dos produtos artesanais.
--	--	--

Houve grandes mudanças nas legislações ao longo dos anos para os queijos artesanais, a começar pela criação de parâmetros específicos para a produção de queijo “minas” padrão com Decreto Lei 30.691, de 29 de março de 1952 (BRASIL, 1952), onde o período de maturação era de vinte dias. Em 1996, com a Portaria 146, de 7 de março (BRASIL, 1996) criada pelo Ministério da Agricultura, Abastecimento e da Reforma Agrária, foram criados os Regulamentos Técnicos de Identidade e Qualidade dos Produtos Lácteos e ficou definido que o queijo feito com leite não pasteurizado deveria ter processo de maturação a uma temperatura superior aos 5°C, durante um tempo não inferior a 60 dias.

Com a Lei Estadual 14.185, de 31 de janeiro de 2002 (Revogada pela Lei nº 20.549 de 18/12/2012) (MINAS GERAIS, 2002) foram definidas Normas para o Processo de Produção de queijo minas artesanal, construção e funcionamento das queijarias artesanais; características físico-químicas e microbiológicas do leite. Já em 2008, o Decreto Estadual 44.864, de 01 de agosto, alterou o Regulamento da Lei 14.185, mudando alguns parâmetros das características físico-químicas e microbiológicas e permitindo a comercialização de queijo minas artesanal no estado de MG, desde que o produtor fosse cadastrado junto ao IMA.

Com a Instrução Normativa 57, de 15 de dezembro 2011 (BRASIL, 2011), o MAPA criou a possibilidade para a redução do período de maturação de queijos artesanais (60 dias), desde que estudos técnico-científicos comprovassem que a redução desse período não comprometesse a qualidade e a inocuidade do produto. E em 2013, com a Portaria 1305 (MINAS GERAIS, 2013), estabeleceu-se que a

maturação para queijo do Serro fosse de 17 dias e para queijo da Canastra, queijo do Cerrado, queijo do Araxá e queijo do Campo das Vertentes fosse de 22 dias, desde que as queijarias fossem integrantes no sistema SISBI-POA. Em 2017, essa portaria foi alterada: o período mínimo de maturação para o queijo do Araxá foi para 14 dias, entretanto, para os demais queijos, não houve alteração (MINS GERAIS, 2017).

No entanto, até o ano de 2018, os queijos e os demais produtos artesanais feitos com matéria-prima de origem animal, caso não estivessem registrados junto ao SISBI, não poderiam ser vendidos em todo o território brasileiro. No caso de um produtor de queijo minas artesanal, ele apenas poderia vender para o estado de origem ou país se tivesse cadastro no PQMA do IMA ou cadastro no SISBI, respectivamente, caso contrário, sua venda era considerada ilegal. Porém, em junho de 2018, por meio da Lei 13.680 (BRASIL, 2018) onde alterou a Lei nº 1.283, de 18 de dezembro de 1950, foi permitida a “comercialização interestadual dos produtos artesanais de origem animal, desde que possuíssem o selo ARTE e que fossem submetidos a inspeção e fiscalização de órgãos de saúde pública dos Estados e do Distrito Federal”; ou seja, um produto artesanal de origem animal agora pode ser vendido em todo o país e não apenas em seu estado, caso tenha inspeção estadual.

Com o Decreto nº 9918 de 18 de julho de 2019 (BRASIL, 2019), houve a regulamentação do 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. Nesse decreto, definiu-se produtos artesanais de origem animal como: “produtos comestíveis elaborados com predominância de matérias-primas de origem animal de produção própria ou de origem determinada, resultantes de técnicas predominantemente manuais adotadas por indivíduo que detenha o domínio integral do processo produtivo, submetidos ao controle do serviço de inspeção oficial, cujo produto final de fabrico é individualizado, genuíno e mantém a singularidade e as características tradicionais, culturais ou regionais do produto”. Além disso, ficou determinado que os estados e o Distrito Federal são responsáveis por conceder o selo ARTE; fiscalizar os produtores artesanais com o selo; elaborar normas para produção artesanal e inserir e manter atualizadas as informações do Cadastro Nacional de Produtores Artesanais. O MAPA será responsável por manter o Cadastro Nacional de Produtores Artesanais com o selo ARTE; auditar o sistema de

concessão de cadastro do selo; fomentar e estabelecer normas técnicas de Boas Práticas Agrícolas (BPA) e BPF para o selo ARTE e elaborar manuais. Já os produtores devem apresentar relatórios de atendimento aos requisitos estabelecidos; comprovar registro no serviço oficial de inspeção e atender aos requisitos de BPA's e BPF's (BRASIL, 2019). Este processo ocorreu com o trabalho em conjunto das secretarias de Inovação, Desenvolvimento Rural e Irrigação (SDI) e da Defesa Agropecuária (SDA) e também de entidades de regulamentação (BRASIL, 2019).

Como pôde ser visto, o estado de Minas Gerais foi o pioneiro na criação de normas para o processo de produção do queijo característico do estado. Estados como Pará, Santa Catarina, Rio Grande do Sul e Rio Grande do Norte também criaram legislações estaduais que atendem a realidade de produção para seus queijos, de acordo com o Quadro 1.

3.3. MATURAÇÃO E CONTROLE DE PATÓGENOS

O período de maturação é muito importante na fabricação de alguns tipos de queijo. A diversidade microbiana presente nesse produto tem um papel importante neste período, podendo auxiliar na determinação das características sensoriais como o sabor, aroma, textura e no controle de patógenos (FUKA et al., 2013).

No início do processo de maturação, há maior predominância de bactérias iniciadoras produtoras de ácido láctico que são responsáveis pela fermentação da lactose e acidificação do meio (FOX & COGAN, 2004). Bactérias dos gêneros *Lactococcus*, *Streptococcus* e *Lactobacillus* auxiliam no desenvolvimento de características sensoriais de queijos, como aroma, sabor e textura (CHHAZLLANI, 2008).

O controle da microbiota presente no queijo pode ocorrer por fatores como a produção de ácidos orgânicos pela própria microbiota presente, ao qual resulta na alteração do pH do meio; criação do baixo potencial de oxi-redução, podendo ocorrer o melhor desenvolvimento de micro-organismos anaeróbios/anaeróbios facultativos no interior do produto; e também por competição por nutrientes. Além disso, durante o período de maturação, ocorre produção de peróxido de hidrogênio, dióxido de carbono, acetaldeído, diacetil e bacteriocinas por bactérias do ácido láctico, contribuindo ainda mais para a inibição de patógenos (McSWEENEY et al., 2017).

O efeito da maturação na segurança de produtos lácteos feitos com leite cru foi avaliado em vários estudos. Martins et al. (2015) determinaram o período mínimo de maturação para queijo minas artesanal do Serro. Foram pesquisados os indicadores de higiene e segurança, por cultivo-dependente, como coliformes totais, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella* e *Listeria monocytogenes*, bem como as características físico-químicas, como: a_w , pH, acidez, cloretos, proteínas, carboidratos e umidade de queijos durante 64 dias de maturação, nos períodos de seca e das chuvas, em duas temperaturas distintas, a de refrigeração ($8 \pm 1^\circ\text{C}$) e a temperatura ambiente ($25 \pm 4^\circ\text{C}$). Adicionalmente, os autores compararam os resultados microbiológicos com os limites estabelecidos por legislação. Ao final do estudo, o período de maturação foi determinado em 17 dias, após todos os parâmetros estarem seguros, de acordo com a legislação. Dores et al. (2013) avaliaram o efeito de diferentes temperaturas sobre patógenos e micro-organismos indicadores durante o período de maturação do queijo Canastra. Esses autores observaram que o queijo maturado em temperatura ambiente por 22 dias foi suficiente para diminuir as contagens de aeróbios mesófilos, coliformes totais, *E. coli* e *S. aureus*, enquanto os queijos maturados sob refrigeração levaram até 64 dias para atingir níveis microbiológicos seguros exigidos pela legislação. Além disso, foi observado que a maturação à temperatura ambiente diminuiu os valores de atividade de água, pH e cloreto de sódio, sugerindo que essas alterações físico-químicas podem ter influenciado no controle de patógenos.

Por outro lado, Mata et al. (2016) avaliaram dois métodos distintos (Lateral Flow System™ e VIDAS®-LMO) para observar o desenvolvimento e controle de *Listeria* durante maturação em amostras de queijo produzidas em laboratório, com leite cru coletado na região de Serro, e outras amostras de queijo coletadas na mesma região. Além disso, eles também avaliaram o comportamento de outros micro-organismos indicadores de higiene. Foi observado que as amostras coletadas na região de Serro não continham *Listeria monocytogenes* e nas amostras que foram inoculadas propositalmente com 10 UFC/mL de *L. innocua* ATCC 33090, não houve eliminação completa deste micro-organismo ao longo do período de maturação de até 60 dias, indicando que a microbiota presente no produto pode não ser capaz de inibir completamente a *Listeria*.

Alemdar & Agaoglu (2010) avaliaram a sobrevivência de *Salmonella* Typhimurium por cultivo-dependente durante maturação de um queijo turco tradicional conhecido como queijo *Herby*, que é semi-duro, salgado, maturado com ervas, fabricado com leite cru de vaca, ovelha ou cabra. Para isso, eles inocularam essa bactéria em duas concentrações distintas, 10^3 e 10^5 UFC/ml, no leite cru de vaca de dois grupos de queijo. Um grupo foi submetido a maturação em salmoura a 4°C (queijo colocado em recipiente de plástico fechado com salmoura 16%) e o outro grupo submetido a maturação em solo (queijo colocado em recipiente de vidro e enterrado) a $9-18^\circ\text{C}$. Eles observaram que ao final da maturação, aos 90 dias, não havia mais o micro-organismo no queijo maturado no solo, já no queijo maturado em salmoura, a bactéria ainda estava presente em 2,6 e 3,15 log NMP/g, para as respectivas inoculações de 10^3 e 10^5 UFC/mL. Além disso, com 60 dias de maturação, a bactéria ainda estava presente em todas as amostras. Apesar destes resultados, vale ressaltar que as condições de produção são bastante distintas do queijo minas artesanal.

Fuka et al. (2013) avaliaram a dinâmica da microbiota durante 0, 45 e 90 dias de maturação de três diferentes queijos croatas (*Istrian*, *Krcki* e *Paski*) produzidos por dois produtores da região, a partir de leite cru de ovelha por meio da amplificação da região 16S do RNAr. Não houve nenhum tipo de inoculação de micro-organismos nesses produtos. Eles notaram que a maturação auxiliou na diminuição da abundância relativa de patógenos como *E. coli* / *Shigella* (58,98% para 3,14% no queijo *Istrian* do produtor 2), *Staphylococcus saprophyticus* (2,28% para 1,14% no queijo *Istrian* do produtor 2; 7,54% para 0,99% do queijo *Krcki* do produtor 1) e *Salmonella* (20,44% para 0,82% no queijo *Istrian* do produtor 2).

Forgrave et al. (2016) avaliaram a cinética da sobrevivência de *Mycobacterium bovis* por cultivo-dependente durante a produção e maturação dois queijos tradicionais do Reino Unido fabricados em laboratório, o Cheddar (queijo duro) e o *Caerphilly* (queijo semi-duro) feitos com leite cru de vaca. Para isso, eles inocularam a bactéria no leite em diferentes concentrações (alta com $1,0 \times 10^3$ a $1,0 \times 10^5$ UFC/g e baixa com $1,0 \times 10^2$ UFC/g) e avaliaram em alguns pontos da maturação. Eles observaram que o valor D do *Cheddar* com alta inoculação foi de 57 dias e do *Caerphilly* foi de 59 dias. Já para os queijos com baixa inoculação, o valor D foi 41 e 24 dias, para o *Cheddar* e *Caerphilly*, respectivamente. Eles concluíram que a maturação teve um papel importante na redução dessa bactéria; que a taxa de redução pode ser entendida como a capacidade de sobrevivência ou em função das propriedades dos queijos

estudados, já que o tipo do queijo influenciou no comportamento do inóculo. Entretanto, em virtude do alto valor D, fica evidente a importância de se evitar a contaminação por esta bactéria no leite.

Como visto pelos estudos supracitados, o período de maturação tem grande influência no controle dos patógenos e indicadores de higiene. Porém, vale ressaltar que o tipo de queijo e a contaminação inicial são fatores importantes a serem considerados para a efetividade da maturação.

3.4. QUEIJO MINAS ARTESANAL DA CANASTRA

O queijo minas artesanal da Canastra é feito a partir do leite cru, submetido à maturação e, normalmente, produzido em pequena escala, de maneira artesanal, por produtores rurais do estado de Minas Gerais, na região da Serra da Canastra (DORES; NOBREGA; FERREIRA, 2013).

Em seu preparo, é utilizado um fermento endógeno chamado “pingo” ou “soro-fermento”, originário do dessoramento do queijo do dia anterior e utilizado para a fermentação do produto diariamente (RESENDE et al., 2011). Esse soro-fermentado, característico de cada queijaria, é muito importante na produção do queijo devido à grande influência que tem no desenvolvimento de suas características sensoriais (RESENDE, 2010). Estudos por metodologias tradicionais de cultivo realizados por Lima et al. (2009), Borelli (2006), Nobrega (2007) e metodologias de cultivo-independente (SANT'ANNA, et al., 2019; ISIDORO, 2019) mostraram que as bactérias lácticas são predominantes no pingo, sendo os gêneros mais comumente encontrados *Lactobacillus*, *Enterococcus*, *Streptococcus* e *Lactococcus*.

Esse produto é produzido na microrregião da Serra da Canastra composta pelos municípios de Delfinópolis, São Roque de Minas, Vargem Bonita, Tapiraí, Bambuí, Medeiros, Piumhi, São João Batista do Glória e Córrego D'Anta (Figura 2), sendo o último município adicionado recentemente por meio da Portaria IMA nº1810, de 24 de abril de 2018 (MINAS GERAIS, 2018). De acordo com dados publicados no Anuário do Leite de 2019 (EMBRAPA, 2019), a produção diária de queijo Canastra no ano de 2018 foi de aproximadamente 16,5 mil quilos, o que resultou, em média, 20 quilos de queijos/dia por produtor. 135 mil litros diários de leite são voltados para

fabricação desse produto, onde aproximadamente 800 famílias fazem da venda do queijo o seu sustento.

Figura 2: Municípios produtores de queijo minas artesanal da Canastra.



Onde: 1- Córrego D'Anta; 2- Tapiraí; 3- Medeiros; 4- Bambuí; 5- São Roque de Minas; 6- Piumhi; 7- Vargem Bonita; 8- São João Batista do Glória e 9-Delfinópolis

Fonte: TargetMap

Por ser um produto artesanal, o queijo minas artesanal da Canastra pode apresentar diferenças físicas, sensoriais e microbiológicas entre um produtor e outro, devido à ausência de padronização na produção entre as queijarias, influenciando nas características do produto final. Fatores como pastagem, período do ano de produção, rebanho, leite, altitude da fazenda, alimentação do rebanho, adição de cloreto de sódio e tempo de maturação influenciam nas características sensoriais do produto. Por outro lado, como é um produto antigo e tradicional, as técnicas utilizadas não passaram por significativas alterações ao longo dos anos, desde o início de sua produção, sendo a maneira de fazer desde a ordenha até o momento da produção do queijo passada de pai para filho (LIMA & DOULA, 2012). Na Figura 3, é apresentado o fluxograma simplificado de produção do queijo minas artesanal da Canastra.

Figura 3: Etapas da produção de Queijo Minas Artesanal da Canastra.

Fonte: Autor

A ordenha do leite é a etapa que antecede a produção do queijo, podendo ser realizada de forma manual ou mecânica. Fatores como a saúde do animal (rebanho nutrido, controle de mastite clínica e sub-clínica, higienização dos úberes e dos tetos dos animais antes (*pré-dipping*) e após (*pós-dipping*) ordenha, fornecimento de alimentação), higienização dos equipamentos e higienização do ambiente da ordenha após o uso são fundamentais para redução da contaminação microbiana nessa etapa (TORRES, 2014). A falta de higienização pode resultar também na incidência de mastite, que é a inflamação das glândulas mamárias e do epitélio glandular que

ocasiona alterações na secreção do leite (GUERREIRO et al., 2005). *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus agalactiae*, bactérias da família Enterobacteriaceae e *Streptococcus uberis* são exemplos de bactérias causadoras da mastite (MENEZES et al., 2014; RADOSTITS; LESLIE; FETROW, 1994).

De acordo com a Lei 20.549 de 18 de dezembro de 2012 (MINAS GERAIS, 2012), o processamento do queijo minas artesanal ocorre da seguinte maneira: em até 90 minutos após a ordenha do leite inicia-se a etapa de filtragem com o objetivo de retirar partículas de sujidades macroscópicas. Nessa fase, alguns produtores adicionam sal ao leite, variando a quantidade de produtor a produtor, 100 a 500g para 100 litros de leite. Em seguida, acontece a fase de coagulação com a adição do fermento natural obtido no dia anterior, o “pingo”, e do coalho de origem animal. A quantidade de pingo a ser adicionada ao produto depende de cada produtor, mas em geral, pode variar de 100 a 500ml para 100 litros de leite (INAES, 2011). O coalho pode ser em pó ou líquido de quimosina de bezerro e/ou pepsina e a quantidade é de acordo com o fabricante.

Após o processo de coagulação, ocorre o corte da massa com o objetivo de obter tamanhos menores da mesma, sendo o tamanho do corte característico de cada microrregião e no caso da Canastra, é inferior a 1 cm. A mexedura tem a função de separar o soro da massa e a dessoragem de retirar o excesso de soro.

A enformagem é realizada adicionando a massa, obtida nas fases anteriores, às formas arredondadas características do produto (queijo Canastra, queijo merendeiro ou queijo Canastra Real), seguida da prensagem manual. A etapa de salga seca é o momento em que o queijo é coberto com sal. De acordo com Borelli (2006), a primeira etapa de salga ocorre em aproximadamente três horas após o início da produção. Essa salga é do tipo seca e a quantidade de sal adicionada depende de cada produtor, podendo variar de 40 a 120g/kg de massa. Após 10 horas do início da produção, ocorre a inversão do queijo e segunda salga. A coleta do “pingo” ou soro-fermento acontece durante toda a noite, após a segunda salga (Figura 3).

A fase de maturação é a fase final da produção do queijo minas artesanal da Canastra. O queijo minas artesanal da Canastra possui o período mínimo de maturação de 22 dias, determinado por legislação (MINAS GERAIS, 2017). Nessa etapa, os queijos podem ser lavados com água corrente potável quantas vezes forem necessárias, variando também a cada produtor. Essa fase é responsável pelo desenvolvimento da cor, sabor, aroma e textura característicos do produto devido á

alterações bioquímicas como lipólise, proteólise e glicólise na matriz do queijo (FOX, 1993; DORES, 2007; SILVA, 2007). 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 bactérias ácido-láticas (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 micro-organismos patogênicos, como *S. aureus*, *L. monocytogenes*, *Salmonella* spp. e outros micro-organismos pertencentes à família Enterobacteriaceae que podem influenciar negativamente a segurança microbiológica do produto (MATA et al., 2016; PERIN et al., 2017; MONTEL et al., 2014; DORES, NOBREGA e FERREIA, 2013; MARTINS et al., 2015). Vale ressaltar que o queijo minas artesanal da Canastra é maturado em prateleiras de madeira, a temperatura ambiente como pode ser observado na Figura 4.

Figura 4: Queijo minas artesanal da Canastra maturando em prateleiras de madeira.



Fonte: Autor

No ano de 2012, o queijo minas artesanal da Canastra conquistou o selo de Indicação Geográfica no quesito de Indicação de Procedência (IP) outorgado pelo

Instituto Nacional de Propriedade Industrial (INPI); ou seja, a região da Serra da Canastra foi reconhecida como referência em extração, fabricação e produção de queijo (ASSOCIAÇÃO DOS PRODUTORES DE QUEIJO CANASTRA, 2011). Nos anos de 2015, 2017 e 2019 os queijos da região da Canastra obtiveram premiações internacionais, sendo que, em junho de 2019, a região da Canastra ganhou 24 das 56 medalhas brasileiras, entre elas Super Ouro, Ouro, Prata e Bronze, no “*Mondial du Fromage et des Produits Laitiers*”, na França (EM, 2015; G1, 2017; G1, 2019).

Os produtores desse tipo de queijo podem ou não ser cadastrados no Programa Queijo Minas Artesanal, o que possibilitava, até 2018, a venda legal deste produto dentro do estado de Minas Gerais. Porém, a Lei nº 13.680, de 14 de junho de 2018 (Brasil, 2018) sobre o processo de fiscalização de produtos alimentícios de origem animal produzidos de forma artesanal alterou a Lei nº 1.283, de 18 de dezembro de 1950, onde diz que agora é “permitida a comercialização interestadual de produtos alimentícios produzidos de forma artesanal, com características e métodos tradicionais ou regionais próprios, empregadas boas práticas agropecuárias e de fabricação, desde que submetidos à fiscalização de órgãos de saúde pública dos Estados e do Distrito Federal”. Portanto, de acordo com a nova lei, os produtos artesanais, que são fiscalizados tanto por órgão de saúde pública do estado como do Distrito Federal, podem ser comercializados em todo o território brasileiro.

3.5. QUEIJO MINAS ARTESANAL DA CANASTRA, MICRO-ORGANISMOS INDICADORES DE SEGURANÇA E PATÓGENOS

O queijo minas artesanal da Canastra é feito a partir do leite cru que pode apresentar uma imensa variedade de bactérias, bolores e leveduras. De acordo com Montel et al. (2014), já foram encontrados mais de 100 gêneros e 400 espécies nessa matéria-prima. Os micro-organismos 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 equipamento do laticínio, teto do animal, tanques de refrigeração e transporte. Como exemplo de fontes indiretas podem ser citados a alimentação do animal, sala de

ordenha, água de lavagem dos equipamentos e material fecal presente na sala de ordenha (MONTEL et al., 2014).

Entre as bactérias patogênicas que podem estar presentes em queijos elaborados a partir de leite cru destacam-se a *Salmonella* spp, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, estirpes patogênicas de *E. coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Bacillus cereus* e *Pseudomonas aeruginosa* (ANDRADE, 2009; MONTEL et al., 2014; VANETTI & PINTO, 2013). Nos queijos artesanais, os microorganismos patogênicos mais comuns são as estirpes patogênicas de *E. coli*, *Salmonella* spp, *L. monocytogenes* e *S. aureus*, resultantes de condições higiênic-sanitárias insatisfatórias (JAY, 2005).

As bactérias da família Enterobacteriaceae contemplam importantes indicadores de higiene e segurança dos alimentos. São bastonetes gram-negativos, não esporogênicos, anaeróbios facultativos (TAKAHASHI, et al., 2017). Gêneros como *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Hafnia*, *Klebsiella*, *Morganella*, *Salmonella*, *Serratia*, *Shigella*, *Yersinia*, *Kluyvera* fazem parte da família Enterobacteriaceae (BRENNER & FARMER III, 2005). Esses indicadores podem revelar contaminações por falta de higiene no processo de fabricação de queijo, má qualidade do leite, armazenamento e transporte inadequado (TORNADIJO et al., 2001; FRANCO & LANDGRAF, 2008).

As bactérias pertencentes ao grupo dos coliformes fazem parte da família Enterobacteriaceae e são capazes de fermentar a lactose produzindo gases, como CO₂ e H₂ e ácidos como ácido lático e ácido acético (FRANCO & LANDGRAF, 2008). Eles são classificados em dois grupos: coliformes totais (temperatura ótima de crescimento de 35°C) e coliformes termotolerantes (temperatura ótima de crescimento entre 44,5°C e 45,5°C) (SILVA et al., 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). *Enterobacter*, *Escherichia*, *Klebsiella* e *Citrobacter* são gêneros de coliformes e sua presença está relacionada a má higienização dos equipamentos utilizados no laticínio, água contaminada, falta de higienização dos manipuladores e possível contaminação fecal, no caso de *E. coli*. 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 (OKURA, 2010). No Brasil, essa bactéria foi a maior

causadora identificada de DTAs entre os anos de 2009 e 2018 (23,4% dos surtos) (BRASIL, 2019). Na França, um surto envolvendo queijo feito a partir de leite cru, *E. coli* O26 foi confirmada como o agente patogênico responsável pelo adoecimento de 15 crianças e um adulto, onde 14 crianças desenvolveram a Síndrome Urêmica Hemolítica (SHU) (FOOD SAFETY NEWS, 2019).

O leite cru pode ser veículo de *L. monocytogenes*, bactéria Gram-positiva, bastonete, não formadora de esporos, anaeróbia facultativa, responsável pela listeriose (LIU, 2006). Nos Estados Unidos cerca de 1.600 pessoas são acometidas com listeriose e cerca de 260 morrem todos os anos, sendo mulheres gestantes, idosos e pessoas com o sistema imunológico enfraquecido os mais vulneráveis (CDC, 2018c). Entre os alimentos envolvidos nos surtos pode-se citar o leite cru e queijos produzidos com essa matéria-prima. Esse patógeno além de ser resistente a processos de congelamento, calor e secagem, pode ser resistente também ao período de maturação do queijo bem como a variações de pH (4,0 – 9,5) e baixa atividade de água (MONTEL et al., 2014; PINTO, et al., 2009; MELO et al., 2015). Segundo Vanetti e 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 micro-organismo 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; DALMASSO & JORDAN, 2014).

A presença de *Salmonella* spp. foi observada em algumas pesquisas realizadas em queijos tradicionais no Brasil (NASSU et al., 2000; FEITOSA et al., 2003). Essa bactéria pertence à família Enterobacteriaceae, é bastonete gram-negativa, não esporulada e capaz de utilizar o citrato como única fonte de carbono (FRANCO & LANDGRAF, 2008). *Salmonella* spp. podem ser encontradas em fezes, contaminando assim o solo e a água (SHINOHARA et al., 2008). Esse micro-organismo está envolvido em muitos surtos alimentares em vários países, sendo que no Brasil, foi o segundo maior agente causador de doenças transmitidas por alimentos (DTA) 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, 2018; FINGER, 2019).

Staphylococcus coagulase positiva é um agente patogênico que muito tem sido encontrado em queijos artesanais (ANDRADE, 2009; PERIN et al., 2017). Essas espécies podem produzir enterotoxinas e quando presentes em quantidade superior a 10^6 UFC/g ou mL podem provocar intoxicações alimentares (VANETTI & PINTO, 2013). No ano de 1999 houve dois surtos causados pela ingestão de queijo minas e leite cru no estado de Minas Gerais, atingindo 378 indivíduos, sendo as enterotoxinas produzidas por *S. aureus* as responsáveis (CARMO et al., 2002). De acordo com Pelisser et al. (2009), a presença desse micro-organismo nos alimentos dá-se pela manipulação excessiva e pela exposição demasiada a temperatura ambiente. No caso de queijos artesanais, esse micro-organismo pode ser transmitido por meio do leite devido a mastite bovina (JOHLER et al., 2018). Em estudo realizado por Dores, Nobrega e Ferreira (2013), esse micro-organismo foi peça chave para definir o tempo de maturação do queijo para que fosse considerado seguro para o consumo humano. No Brasil, entre os anos de 2009 e 2018, *S. aureus* foi o terceiro agente etiológico maior causador de DTA (9,4% dos surtos) (BRASIL, 2019).

O queijo canastra enquadra-se na legislação de queijo minas artesanal bem como de queijo com média umidade descritos 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.

Parâmetros Microbiológicos	Limites
Coliformes 30° C (UFC/g) ^b	n = 5; c = 2; m = 1.000; M = 5.000
Coliformes 45° C (UFC/g) ^{b,*}	n = 5; c = 2; m = 100; M = 500
<i>Staphylococcus</i> coagulase positiva (UFC/g) ^a	n = 5; c = 2; m = 100; M = 1.000
<i>Listeria</i> sp./25g ^a	n = 5; c = 0; m = 0
<i>Salmonella</i> spp./25g ^a	n = 5; c = 0; m = 0

Fonte: Decreto nº 42.645, de 05 de junho de 2002 (Minas Gerais, 2002) (parâmetros com a letra ^a) e Decreto nº 44.864, de 01 de agosto de 2008 (Minas Gerais, 2008) (parâmetros com a letra ^b) * neste trabalho foi realizada a contagem de *E. coli*, adotando-se o limite estabelecido para coliformes a 45 ° C.

Mesmo com o grande mercado que esse produto artesanal vem conquistando nos últimos tempos, ainda assim o conhecimento científico microbiológico dos indicadores de higiene, o efeito da maturação diante dos patógenos, os limites microbiológicos requeridos pela legislação, bem como a eficiência da cadeia produtiva necessitam de respostas. Diante deste cenário, este trabalho teve como objetivo avaliar os indicadores microbiológicos e características físico-químicas de amostras de queijos minas artesanais da Canastra durante e após o período de maturação de 22 dias, conforme a legislação vigente (MINAS GERAIS, 2017) de produtores cadastrados e não cadastrados no PQMA. Com isso, o estudo pode auxiliar aos produtores no entendimento do panorama atual de qualidade microbiológica desse tipo de produto, avaliar a eficácia das boas práticas de fabricação que estão sendo implementadas nas queijarias e observar o controle dos indicadores de segurança e patógenos durante o período de maturação.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. COLETA DAS AMOSTRAS

Este trabalho foi dividido em dois estudos: um denominado “longitudinal” e o outro “transversal”.

O estudo longitudinal foi realizado ao longo da maturação em três produtores rurais cadastrados no Programa Queijo Minas Artesanal, localizados no município de São Roque de Minas, na região da Serra da Canastra - MG. Foram utilizadas três unidades de queijo em cada produtor e 10 mL ou gramas de amostras foram coletas em 11 pontos amostrais, pré-determinados, a saber: leite cru, cultura endógena “pingo”, massa antes da primeira salga (3 horas após o início da produção), massa após a primeira salga (10 horas após o início da produção), massa após segunda salga (16 horas após o início da produção); queijos com 24, 48 e 72 horas de maturação e queijos com 7, 14 e 22 dias de maturação. As amostras foram coletadas e analisadas imediatamente no Laboratório da Associação dos Produtores de Queijo Canastra (APROCAN), na cidade de São Roque de Minas – MG, caracterizando-se como um estudo “*in loco*”. Os meses de coleta foram junho e julho de 2018.

O estudo transversal foi realizado após o período de maturação do queijo. Uma unidade de queijo minas artesanal da Canastra com 22 dias de maturação foi coletada

de 36 produtores rurais de São Roque de Minas, 39 produtores de Medeiros e 3 produtores de Tapiraí, totalizando-se 78 produtores da região, sendo que 26 são cadastrados no Programa Queijo Minas Artesanal. As amostras foram transportadas refrigeradas a 4 °C para o Laboratório de Microbiologia de Alimentos da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP, localizado na cidade de São Paulo - SP. Ao chegar ao laboratório, as amostras foram analisadas. O período de coleta foi entre os meses de julho de 2017 e abril de 2018.

Os resultados microbiológicos obtidos foram comparados com o limite “M” para coliformes 30°C, coliformes 45°C, *Staphylococcus* coagulase positiva e “m” para *Salmonella* e *L. monocytogenes* presentes 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).

4.2. DETECÇÃO DE *Salmonella* spp.

A detecção de *Salmonella* spp. foi feita no estudo transversal por meio de dois métodos: convencional e molecular (PCR convencional) e os resultados foram expressos em presença/ausência de *Salmonella* em 25g de queijo.

4.2.1. MÉTODO CONVENCIONAL

A detecção de *Salmonella* spp., pelo método convencional, nas amostras de queijo foi realizada utilizando-se a metodologia ISO 6579: 2002/Corr 1:2004/Amendment 1:2007 (INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION, 2007), onde 25 g da amostra foram homogeneizadas com 225 mL de água peptonada tamponada – BPW (Kasvi, Itália) em *Stomacher* (AES Laboratoire, França) e incubadas a $37 \pm 1^\circ\text{C}/18 \pm 2$ horas.

Na etapa de enriquecimento seletivo, foi transferido 0,1 mL das amostras pré-enriquecidas para um tubo contendo 10 mL de Caldo Rappaport-Vassilidis R10 Broth – RV (Difco™, EUA) e 1 mL das amostras pré-enriquecidas para outro tubo contendo 10 mL de Caldo Tetrionato Broth Base - TT (Difco™, EUA). Os tubos com caldo RV

foram incubados a $41,5 \pm 1,0$ °C/24 \pm 3 horas e os com caldo TT a 37 ± 1 °C/24 \pm 3 horas.

Após o período de incubação do enriquecimento seletivo, os caldos foram estriados em superfície de placas com Ágar Xilose Lisina Desoxicolato – XLD (Kasvi, Itália) e Ágar Enterico de Hectoen – HE (Difco™, EUA), incubadas invertidas a 37 ± 1 °C/24 \pm 3 horas. Colônias suspeitas de *Salmonella* spp. dessas placas foram selecionadas e submetidas a confirmação bioquímica através do teste de crescimento em Ágar Tríplice Açúcar Ferro – TSI (Difco™, EUA) e em Ágar Lisina Ferro – LIA (Difco™, EUA). Tubos com reação típica foram submetidos à prova de soro-aglutinação em lâmina com soro polivalente para *Salmonella* spp. (Probac, Brasil), tendo os resultados expressos em presença ou ausência de *Salmonella* spp. em 25 g de queijo.

4.2.2. MÉTODO MOLECULAR (PCR CONVENCIONAL)

O pré-enriquecimento foi o mesmo descrito no item 4.2.1. A extração do DNA bacteriano ocorreu em 1 mL da amostra pré-enriquecida, utilizando-se o kit comercial mericon DNA Bacteria (QIAGEN, Germany), conforme instruções descritas pelo fabricante. O volume estabelecido utilizado para o mix da reação foi de 25 μ L composto por 12,5 μ L de 2x Qiagen Taq PCR Master mix [Tris-HCl, KCl e (NH₄)₂SO₄ buffer, pH 8,7; 3 mM MgCl₂, 400 μ L de cada dNTP e 0.05 U/ μ L de Taq polimerase], 1 μ L do iniciador senso (25 μ L de concentração) e 1 μ L do iniciador anti-senso (25 μ L de concentração), 9,5 μ L de água ultra pura e 1 μ L de DNA extraído. O processo de amplificação foi realizado em termociclador (Veriti 96, Applied Biosystems, Thermofischer), constituindo-se de uma etapa de desnaturação a 95 °C durante 1 min, seguido de 35 ciclos a 95 °C durante 20 s, anelamento a 55 °C durante 20s, extensão a 72 °C durante 2 min e a extensão final do DNA a 72°C por 4 min. Todas as amplificações incluíram controle positivo (*Salmonella* Typhimurium ATCC 14028) e negativo (água ultra pura). Foram utilizados os oligonucleotídeos iniciadores para o gene *invA*, onde o primer senso (F): 5' TAT CGC CAC GTT CGG GCA A-3' e primer anti-senso (R): 5' TCG CAC CGT CAA AGG AAC C-3', que delimitaram um fragmento de 275 pares de base (pb) (NAYAK et al., 2004).

Para analisar os fragmentos, foi utilizada a técnica de eletroforese em gel de agarose a 2,0% corado com Syber Safe (1 μ L/10mL) e tampão TBE 0,5X (pH 8,0). O gel foi submetido á eletroforese de 100V por 45 minutos. A leitura do resultado foi feita em transiluminador ultra-violeta – 320 nm (Bio-rad Laboratories Inc. Hercules, EUA) e os resultados das bandas foram comparados com o marcador de peso molecular DNA ladder de 100 pb (Invitrogen, Carlsbad, EUA).

4.3. DETECÇÃO DE *Listeria monocytogenes*

A detecção de *Listeria monocytogenes* foi feita no estudo transversal por meio de dois métodos: convencional e molecular (PCR convencional) e os resultados foram expressos em presença/ausência de *L. monocytogenes* em 25g de queijo.

4.3.1 MÉTODO CONVENCIONAL

A detecção de *Listeria monocytogenes*, por metodologia convencional, nas amostras de queijo foi realizada utilizando-se o método ISO 11290-1:1996/Amendment 1:2004 com modificações (INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION, 2004), onde 25 g da amostra foram homogeneizadas com 225 mL de caldo Half Fraser (Oxoid, Inglaterra) em *Stomacher* (AES Laboratoire, França) e incubadas a $20 \pm 1,0$ °C/1 hora, após esse período, foram adicionados 5 ml de suplemento Half Fraser (Oxoid, Inglaterra) e incubadas a $30 \pm 1,0$ °C/24 \pm 2 horas.

Na etapa de enriquecimento secundário, foi transferido 0,1 mL das amostras do enriquecimento primário para um tubo contendo 10 mL de Caldo Fraser (Oxoid, Inglaterra) contendo 0,1 mL de Suplemento Fraser (Oxoid, Inglaterra). Os tubos foram incubados a 37 ± 1 °C/48 \pm 2 horas.

Após o período de incubação do enriquecimento secundário, os caldos foram estriados em superfície de placas com Ágar Base Oxford Listeria - OXA (Oxoid, UK) e Ágar Base PALCAM (Oxoid, Inglaterra), incubadas invertidas a 37 ± 1 °C/24 \pm 3 horas. Colônias suspeitas de *Listeria monocytogenes* foram selecionadas e transferidas para purificação em placa de Ágar Trypticase de Soja Extrato de Levedura

(TSA-YE; Oxoid, Inglaterra), onde foram incubadas a 37 ± 1 °C/18 - 24 horas. As colônias características foram submetidas a confirmação através de: 1) Coloração de Gram, onde foi preparado um esfregaço e submetido a coloração de Gram e observado em Microscópio Óptico; 2) Motilidade onde foi inoculada por picada cada colônia suspeita em um tubo contendo 5 ml de meio semi-sólido de Meio Teste Motilidade (BD, EUA) e incubado a 20-25 °C/7 dias; 3) Teste de Verificação de Hemólise onde foi inoculada por picada a colônia característica na placa de Ágar Sangue nº 2 e incubada a 35 °C/24 – 48 horas; 4) Teste de fermentação de dextrose, xilose, rhamnose e manitol onde foi inoculada por picada a colônia suspeita na placa de Ágar Púrpura Base (BD, EUA) suplementado com 0,5% de cada carboidrato testado e incubada a 35 °C/7 dias. Os resultados foram expressos em presença ou ausência de *Listeria monocytogenes* em 25 g de queijo.

4.3.2. MÉTODO MOLECULAR (PCR CONVENCIONAL)

O pré-enriquecimento foi o mesmo descrito no item 4.2.1. A extração do DNA bacteriano ocorreu em 1 mL da amostra pré-enriquecida, utilizando-se o kit comercial mericon DNA Plus Bacteria (QIAGEN, Alemanha), conforme instruções descritas pelo fabricante. O volume estabelecido utilizado para o mix da reação foi de 20 µL composto por 10 µL de 2x Qiagen Taq PCR Master mix [Tris-HCl, KCl e (NH₄)₂SO₄ buffer, pH 8.7; 3 mM MgCl₂, 400 µL de cada dNTP e 0.05 U/ µL de Taq polimerase], 1 µL do iniciador senso (25 µL de concentração) e 1 µL do iniciador anti-senso (25 µL de concentração) e 6 µL de água ultra pura e 2 µL do DNA bacteriano extraído. O processo de amplificação foi realizado em termociclador (Veriti 96, Applied Biosystems, Thermofischer), constituindo-se de uma etapa de desnaturação a 94 °C durante 2 min, seguido de 35 ciclos a 94 °C durante 30 s, anelamento a 54 °C durante 30s, extensão a 74 °C durante 45 s e a extensão final do DNA a 74°C por 10 min. Todas as amplificações incluíram controle positivo (*Listeria monocytogenes* ATCC 7644) e negativo (água ultra pura). Foram utilizados os oligonucleotídeos iniciadores para o gene *prfA*, onde o primer senso Lip 1 (F): 5' GAT ACA GAA ACA TCG GTT GGC 3' e primer anti-senso Lip 2 (R): 5' GTG TAA CTT GAT GCC ATC AGG 3', que delimitaram um fragmento de 274 pares de base (pb) (KURELJUŠIĆ, 2017).

Para analisar os fragmentos, foi utilizada a técnica de eletroforese em gel de agarose a 2,0% corado com Syber Safe (1 µL/10mL) e tampão TBE 0,5X (pH 8,0). O gel foi submetido a voltagem de 100V por 45 minutos. A leitura do resultado foi feita em transiluminador ultra-violeta – 320 nm (Bio-rad Laboratories Inc. Hercules, EUA) e os resultados das bandas foram comparados com o marcador de peso molecular DNA ladder de 100 pb (Invitrogen, Carlsbad, EUA).

4.4. ENUMERAÇÃO DE Enterobacteriaceae

A enumeração das bactérias da família Enterobacteriaceae foi realizada no estudo transversal, onde 25g de amostra foram homogeneizadas com 225 mL de água peptonada 0,1% (Oxoid, Inglaterra) em *Stomacher* (AES Laboratoire, França), a fim de se obter diluições 1:10, a partir das quais foram realizadas diluições subsequentes. A enumeração de Enterobacteriaceae foi realizada em duplicata seguindo as normas da APHA 9.62:2015 (KORNACKI et al., 2015), onde 1 mL de cada diluição foi plaqueado em profundidade em Ágar Vermelho Violeta Bile com Glicose – VRBG (Kasvi, EUA) e incubado a 35 °C/18 – 24 horas. A enumeração de Enterobacteriaceae foi expressa em log UFC/g de queijo.

4.5. ENUMERAÇÃO DE COLIFORMES TOTAIS E *Escherichia coli*

A enumeração de coliformes totais e *E. coli* foi realizada utilizando-se placas Petrifim® EC (3M, EUA) com metodologia de acordo com o fabricante 3M Company (3M, 2014).

No estudo transversal, 25g de amostra foram homogeneizadas com 225 mL de água peptonada 0,1% (Oxoid, Inglaterra) em *Stomacher* (AES Laboratoire), a fim de se obter diluições 1:10, a partir das quais foram realizadas diluições subsequentes. A enumeração foi realizada em duplicata.

No estudo longitudinal, 10 g ou mL de amostra foram homogeneizadas com 90 mL de água peptonada 0,1% (Oxoid, Inglaterra), a fim de se obter diluições 1:10, a

partir das quais foram realizadas diluições subsequentes. A enumeração foi realizada em triplicata.

4.6. ENUMERAÇÃO DE *Staphylococcus coagulase positiva*

A enumeração de *Staphylococcus coagulase positiva* foi realizada utilizando-se placas Petrifim® STX (3M, EUA) com metodologia de acordo com o fabricante 3M Company (3M, 2016). O disco Petrifilm Staph Express de DNase foi utilizado quando foram observadas na placa colônias diferentes das vermelho-violetas.

No estudo transversal, 25g de amostra foram homogeneizadas com 225 mL de água peptonada 0,1% (Oxoid, Inglaterra) em *Stomacher* (AES Laboratoire, França), a fim de se obter diluições 1:10, a partir das quais foram realizadas diluições subsequentes. A enumeração foi realizada em duplicata.

No estudo longitudinal, 10 g de amostra foram homogeneizadas com 90 mL de água peptonada 0,1% (Oxoid, Inglaterra), a fim de se obter diluições 1:10, a partir das quais foram realizadas diluições subsequentes. A enumeração foi realizada em triplicata.

4.6.1. TESTE DE COAGULASE POSITIVA

Esse teste foi realizado no estudo transversal, onde, pelo menos cinco colônias confirmadas pelo teste de DNase em Petrifim® STX foram selecionadas para a segunda etapa de confirmação de coagulase positiva das colônias presuntivas. As colônias selecionadas foram transferidas da placa de Petrifim® STX para tubos contendo 3 ml de Brain Heart Infusion (BHI; BD, EUA) e incubadas a 37°C/18-24 horas.

Após o período de incubação, 0,1 ml de cultura de micro-organismos foram transferidos para um tubo estéril contendo 0,3 ml de Coagu-Plasma (LB, BRASIL). Os tubos foram incubados a 37°C ± 1 °C /4-6 horas. A leitura de coagulase foi realizada conforme indicação da metodologia ISO 6888-1:1999/Amd 1:2003 (ISO, 2003).

4.7. AFERIÇÃO DO pH

No estudo longitudinal, a aferição do pH do leite, pingo e queijo ao longo da maturação foi realizada com pHmetro digital (HI99163 – Hanna Instruments, Itália), onde os valores foram aferidos diretamente no produto. Os valores foram obtidos em triplicata.

No estudo transversal, a aferição do pH do queijo maturado foi realizada em duplicata, de acordo com o método IAL 017/IV (2008), onde foram pesadas 10 g de amostra e homogeneizadas em 100 ml de água destilada durante 30 minutos com agitador magnético (Fisatom, Brasil). Após os 30 minutos, aguardou-se mais 10 minutos e então o pH foi aferido em pHmetro digital (BEL engineering® PHS3BW, Itália).

4.8. AFERIÇÃO DA ATIVIDADE DE ÁGUA (a_w)

A aferição da atividade de água foi realizada no estudo transversal em duplicata por meio de analisador de atividade de água digital AquaLab (EUA) onde foram pesadas 3 g de amostra e inseridas no analisador. O queijo foi mantido a temperatura ambiente para realização da análise.

4.9. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Foram realizados os testes de *t de Student*, análise de variância (ANOVA), teste de Tukey para comparação de médias e teste de correlação de Pearson. Os dados foram avaliados no programa MiniTab 18.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. ESTUDO LONGITUDINAL

O estudo realizado durante a maturação foi de grande importância para observar o comportamento dos indicadores de higiene e segurança, bem como o pH frente a esse período e verificar se o pH tem influência nas contagens. De acordo com os resultados, tanto as contagens de coliformes totais, *E. coli* e *Staphylococcus* coagulase positiva bem como o pH mostraram-se diferentes estatisticamente ($p < 0,05$) no decorrer da maturação. Esses resultados indicam que a maturação tem influência nas características do produto analisado. As contagens dos micro-organismos indicadores bem como os valores de pH obtidos dos produtores P1, P2 e P3 podem ser visualizadas nas Tabelas 2, 3 e 4 e a variação dos mesmos a partir das massas de queijo (3 horas após o início da produção) também pode ser vista nas Figuras 5, 6 e 7, respectivamente. Os círculos das Figuras 5, 6 e 7 representam o momento em que cada indicador analisado atingiu o limite requerido pela legislação.

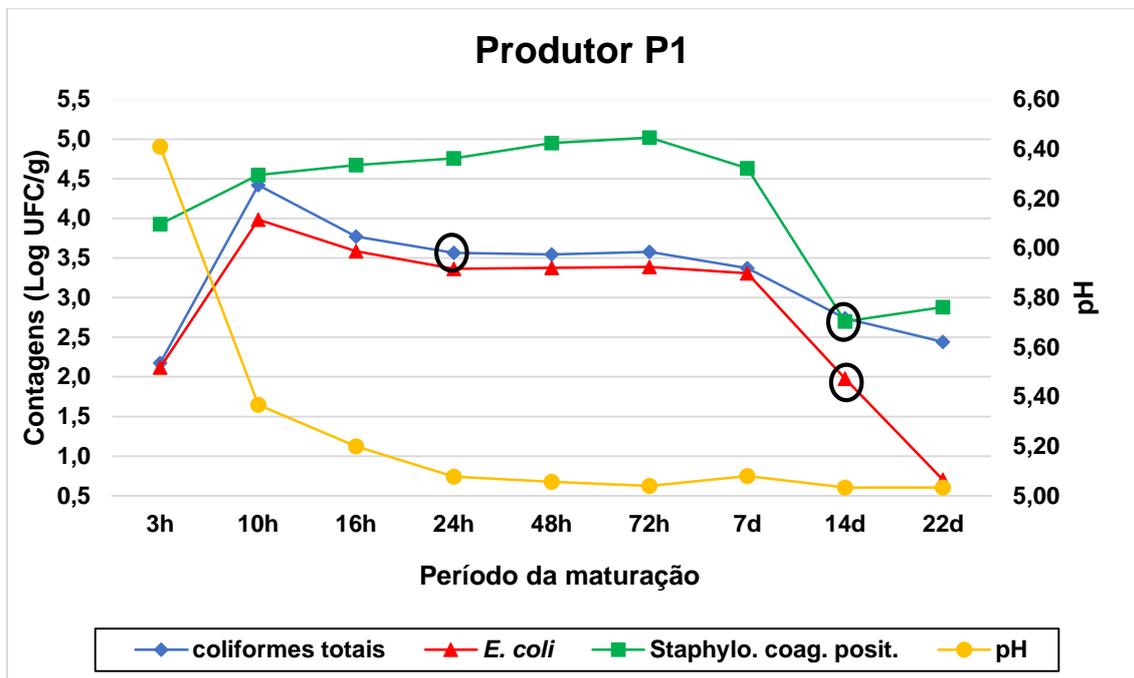
Tabela 2: Contagem de coliformes totais, *E. coli* e *Staphylococcus* coagulase positiva em log UFC/g ou mL e resultado do pH do leite, pingo, massa e queijo durante a maturação no produtor P1.

Tempo/ análises	pH (Média±DP)	Coliformes totais (Média±DP) (Log UFC/g)	<i>E. coli</i> (Média±DP) (Log UFC/g)	<i>Staphylococcus</i> coagulase positiva (Média±DP) (Log UFC/g)
Leite	6,70 ^a	1,2±0,2 ^f	*0,7±0,9 ^c	2,3 ^c
Pingo	5,70 ^c	1,7 ^{ef}	1,2±0,2 ^b ^c	2,3 ^c
3h	6,41±0,10 ^b	2,2±0,3 ^{de}	2,1±0,3 ^b	3,9±0,2 ^b
10h	5,37±0,04 ^d	4,4±0,1 ^a	4,0 ^a	4,5±0,2 ^a
16h	5,20±0,05 ^{de}	3,8±0,2 ^b	3,6±0,4 ^a	4,7±0,1 ^a
24h	5,08±0,05 ^e	3,6±0,1 ^b	3,4±0,1 ^a	4,8±0,1 ^a
48h	5,06±0,03 ^e	3,5±0,1 ^b	3,4±0,1 ^a	4,9±0,1 ^a
72h	5,04±0,11 ^e	3,6±0,2 ^b	3,4±0,2 ^a	5,0±0,1 ^a
7d	5,08±0,10 ^e	3,4±0,2 ^b	3,3±0,3 ^a	4,6±0,2 ^a
14d	5,03±0,04 ^e	2,7±0,1 ^c	2,0±0,5 ^b	2,7 ^c
22d	5,03±0,03 ^e	2,4±0,3 ^{cd}	*0,7±0,6 ^c	2,9±0,4 ^c

^{abcde} Médias na mesma coluna seguidas de letras diferentes diferem entre si ($p < 0,05$ – Teste de Tukey).

*Valores < 1 log UFC/g são dados estimados (presença de colônias em uma ou duas das placas da triplicata), uma vez que estão abaixo do limite de detecção do método (1 log UFC/g).

Figura 5: Variação do pH e das contagens dos micro-organismos na massa e queijo ao longo da maturação no produtor P1.



Eixo "X" apresentado fora de escala. Onde h= horas, d=dias.

Valores circulados indicam que as amostras atingiram os limites estabelecidos pela legislação (log UFC/g) para amostra indicativa: Coliformes totais: 3,7; *E. coli*: 2,7; *Staphylococcus*: 3,0.

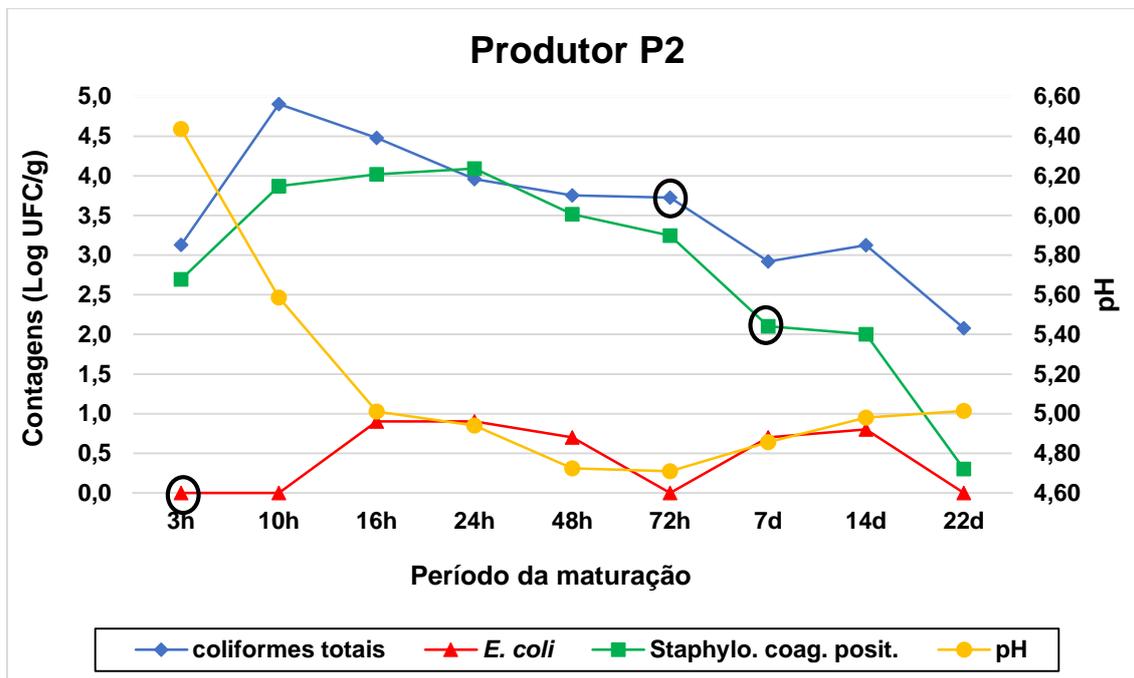
Legislações de referência: Decreto nº 42.645, de 05 de junho de 2002 (Minas Gerais, 2002) e Decreto nº 44.864, de 01 de agosto de 2008 (Minas Gerais, 2008).

Tabela 3: Contagem de coliformes totais, *E. coli* e *Staphylococcus coagulase* positiva em log UFC/g ou mL e resultado do pH do leite, pingo, massa e queijo durante a maturação no produtor P2.

Tempo/ análises	pH (Média±DP)	Coliformes totais (Média±DP) (Log UFC/g)	<i>E. coli</i> (Média±DP) (Log UFC/g)	<i>Staphylococcus</i> coagulase positiva (Média±DP) (Log UFC/g)
Leite	6,60 ^a	1,6 ^f	<1	2,4±0,3 ^{def}
Pingo	4,75±0,07 ^{de}	3,2 ^d	<1	3,2±0,2 ^{bcd}
3h	6,44±0,02 ^a	3,1±0,1 ^d	<1	2,7±0,1 ^{cde}
10h	5,59±0,14 ^b	4,9±0,1 ^a	<1	3,9±0,1 ^{ab}
16h	5,01±0,03 ^{cd}	4,5±0,1 ^b	*0,9±0,8 ^a	4,0±0,1 ^a
24h	4,94±0,08 ^{cde}	4,0±0,1 ^c	*0,9±0,8 ^a	4,1±0,2 ^a
48h	4,72±0,05 ^e	3,8±0,2 ^c	*0,7±0,6 ^a	3,5±0,1 ^{ab}
72h	4,71±0,16 ^e	3,7±0,1 ^c	<1	3,2±0,5 ^{bc}
7d	4,86±0,03 ^{cde}	2,9±0,2 ^d	*0,7±0,6 ^a	2,1±0,2 ^{ef}
14d	4,98±0,07 ^{cd}	3,1±0,1 ^d	*0,8±0,8 ^a	2,0±0,3 ^f
22d	5,01±0,01 ^c	2,1±0,1 ^e	<1	<1

^{abcdefg} Médias na mesma coluna seguidas de letras diferentes diferem entre si ($p < 0,05$ – Teste de Tukey).
*Valores < 1 log UFC/g são dados estimados (presença de colônias em uma ou duas das placas da triplicata), uma vez que estão abaixo do limite de detecção do método (1 log UFC/g).

Figura 6: Variação do pH e das contagens dos micro-organismos na massa e queijo ao longo da maturação no produtor P2.



Eixo "X" apresentado fora de escala. Onde h= horas, d=dias.

Valores circulos indicam que as amostras atingiram os limites estabelecidos pela legislação (log UFC/g) para amostra indicativa: Coliformes totais: 3,7; *E. coli*: 2,7; *Staphylococcus*: 3,0.

Legislações de referência: 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).

*Devido à escala logarítmica, para que fosse possível a plotagem dos dados com ausência de colônias nas placas (abaixo do limite de detecção do método), foi adotado o log (1) que é igual a zero.

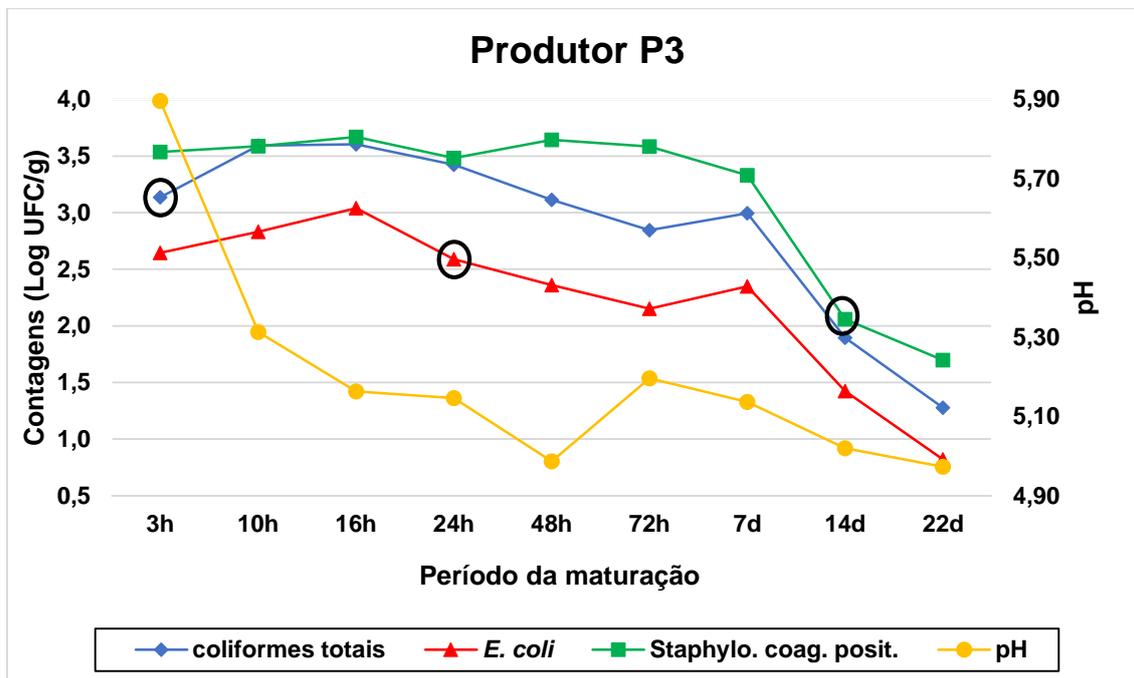
Tabela 4: Contagem de coliformes totais, *E. coli* e *Staphylococcus coagulase* positiva em log UFC/g ou mL e resultado do pH do leite, pingo, massa e queijo durante a maturação no produtor P3.

Tempo/ análises	pH (Média±DP)	Coliformes totais (Média±DP) (Log UFC/g)	<i>E. coli</i> (Média±DP) (Log UFC/g)	<i>Staphylococcus</i> coagulase positiva (Média±DP) (Log UFC/g)
Leite	6,70 ^a	1,9 ^d	1,7±0,1 ^{cde}	2,8±0,3 ^b
Pingo	5,00 ^{efg}	2,9±0,2 ^c	3,4±0,2 ^a	2,6±0,2 ^b
3h	5,90±0,03 ^b	3,1 ^{bc}	2,6 ^{abc}	3,5±0,2 ^a
10h	5,31±0,10 ^c	3,6±0,1 ^a	2,8±0,1 ^{ab}	3,6±0,2 ^a
16h	5,16±0,08 ^{cde}	3,6±0,2 ^a	3,0±0,4 ^{ab}	3,7±0,1 ^a
24h	5,15±0,04 ^{def}	3,4±0,2 ^{ab}	2,6±0,2 ^{abc}	3,5±0,1 ^a
48h	4,99±0,01 ^{fg}	3,1 ^{bc}	2,4±0,2 ^{bc}	3,6 ^a
72h	5,20±0,09 ^{cd}	2,9±0,2 ^c	2,2±0,3 ^{bcd}	3,6 ^a
7d	5,14±0,03 ^{def}	3,0±0,1 ^c	2,4±0,1 ^{bc}	3,3±0,1 ^a
14d	5,02±0,04 ^{efg}	1,9±0,1 ^d	1,4±0,3 ^{de}	2,1±0,3 ^c
22d	4,97±0,05 ^g	1,3±0,2 ^e	*0,8±0,7 ^e	1,7 ^c

^{abcdefg} Médias na mesma coluna seguidas de letras diferentes diferem entre si ($p < 0,05$).

*Valores < 1 log UFC/g são dados estimados (presença de colônias em uma ou duas das placas da triplicata), uma vez que estão abaixo do limite de detecção do método (1 log UFC/g).

Figura 7: Variação do pH e das contagens dos micro-organismos na massa e queijo ao longo da maturação no produtor P3.



Eixo "X" apresentado fora de escala. Onde h= horas, d=dias.

Valores circulos indicam que as amostras atingiram os limites estabelecidos pela legislação (log UFC/g) para amostra indicativa: Coliformes totais: 3,7; *E. coli*: 2,7; *Staphylococcus*: 3,0.

Legislações de referência: 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 limites microbiológicos para leite cru encontram-se no Decreto 42.645 (MINAS GERAIS, 2002), onde para *S. aureus* a contagem estabelecida deve ser inferior a 100 UFC/ml (ou 2,0 log UFC/ml) e para *E. coli* inferior a 100 UFC/ml (ou 2,0 log UFC/ml). As contagens de *E. coli* no leite encontradas em todas as queijarias ficaram dentro do limite estabelecido por legislação. Martins et al. (2015) avaliaram o leite usado na produção de queijo do Serro nos períodos da seca e chuva e observaram valores maiores de *E. coli* quando comparados ao do estudo presente, sendo 1,50 e 1,78 log UFC/g para período da seca e chuva, respectivamente. Ombarak et al. (2016), observaram que aproximadamente 76% das amostras de leite cru utilizadas na fabricação de queijo no Egito continham *E. coli*. Em estudo realizado por D'amico e Donnelly (2010) observou-se que 96% das fazendas produtoras de queijo artesanal fabricadas com leite cru de vaca obtiveram valores <100 UFC/mL de coliformes totais, assemelhando-se a esse estudo, onde todas as fazendas obtiveram valores abaixo de 2,0 log de UFC/ml de coliformes totais. Vale lembrar que não há

limites estabelecidos por legislação para coliformes totais em leite cru usado para fabricação de queijo minas artesanal. As amostras do leite cru das queijarias dos produtores P1, P2 e P3 ultrapassaram os limites para *S. aureus* (2,0 log UFC/g) e obtiveram contagens de 2,3; 2,4 e 2,8 log UFC/ml, respectivamente. Sobrinho et al. (2012) avaliaram a qualidade microbiológica de leite cru utilizado para fabricação de queijo do Serro e observaram que de 154 amostras em 145 havia *S. aureus* e que as contagens obtidas variaram de 1,47 a 5,03 log UFC/mL. D'Amico & Donnelly (2010) avaliaram a qualidade microbiológica de leite cru utilizado para fabricação de queijos artesanais em Vermont e observaram que em 67% das amostras foi detectado *S. aureus* e a média de contagens foi de 20 UFC/mL, sendo bem abaixo da média observada nesse estudo.

Uma das principais vias de contaminação do leite cru por *S. aureus* é a ocorrência de mastite bovina. Por estar presente nas glândulas mamárias dos bovinos, o leite cru pode ser o veículo desse patógeno para o queijo (GRABER et al., 2009; JOHLER et al., 2011; BOSS et al., 2016; KÜMMEL et al., 2016). Manipulação pelos funcionários e equipamentos contaminados também podem ser fontes de contaminação desse micro-organismo (JAMALI et al., 2015; JØRGENSEN, MØRK & RØRVIK, 2005). Existem formas de evitar esse tipo de contaminação como o controle da saúde do animal; após a constatação da mastite, evitar que o animal tenha contato com outros animais; higienização do teto do animal antes e após a ordenha; higienização dos manipuladores e higienização dos equipamentos utilizados (JAMALI et al., 2015).

As cargas microbianas do pingo de coliformes totais ficaram entre 1,7 e 3,2 log UFC/mL, de *E. coli* entre <1 e 3,4 log de UFC/mL e *Staphylococcus coagulase* entre 2,3 e 3,2 log UFC/mL. Paiva (2012) observou no pingo coletado no período do inverno usado para produção de queijo da Canastra contagens de coliformes de $5,0 \times 10^3$ UFC/mL, *E. coli* $1,7 \times 10^2$ UFC/mL e *S. aureus* $1,0 \times 10^2$ UFC/mL, assemelhando-se as contagens obtidas nesse estudo. Oliveira (2014) obteve contagens superiores de *S. aureus* às observadas nesse trabalho, no pingo coletado na região Serro no período das chuvas $7,3 \times 10^4$ UFC/mL. A criação de parâmetro microbiológico para o pingo em legislação de queijo minas artesanal deve ser avaliada. Em estudo realizado por Isidoro (2019), em queijo minas artesanal da Canastra, concluiu-se que a microbiota do pingo modela a microbiota do queijo, visto que, em média 44% das bactérias encontradas no pingo também foram encontradas no queijo e que 64% da diversidade

bacteriana encontrada nos queijos é proveniente do pingo, havendo assim, uma forte correlação entre as microbiotas, ao qual foi comprovada por testes estatísticos. Outros estudos realizados com queijos fabricados com leite cru que empregam soro fermento natural, coletado da mesma maneira que o queijo da Canastra, também concluíram que esse fermento tem grande influência na microbiota do queijo (GATTI et al., 2014; DE FILIPPIS et al., 2014).

Em todos os produtores, observou-se que a carga microbiana inicial no leite e no pingo foi menor do que na massa após três horas do início da produção. A exceção foi para contagem de *E. coli* no produtor P3, havendo uma maior carga microbiana inicial no pingo. Esse aumento da carga microbiana nas primeiras horas de produção também foi observado em outros estudos (JAKOBSEN et al., 2011; DELBES et al., 2006; DORES, NOBREGA & FERREIRA, 2013; MARTINS et al., 2015). As maiores cargas microbianas, sejam elas de coliformes, *E. coli* e *Staphylococcus* coagulase positiva, nas primeiras 24 horas de produção podem estar relacionadas a retenção física de micro-organismos na coalhada (massa) provenientes das matérias-primas, alta umidade e alta atividade de água, ao crescimento microbiano durante a coagulação, bem como pelo contato manual do manipulador no alimento (desenformagem, prensa manual) e equipamentos mal higienizados (DORES, NOBREGA & FERREIRA, 2013; DIEZHANDINO et al., 2015).

As amostras do produtor P1 alcançaram os limites aceitáveis pela legislação para coliformes totais para o queijo com 24 horas de produção; já os limites de *E. coli* e *Staphylococcus* coagulase positiva foram atingidos com 14 dias de maturação. Pode-se observar na Tabela 2 que das 24 horas de produção até os 22 dias de maturação houve um decréscimo de 3,6 para 2,4 log de UFC/g (1,2 log de redução) de coliformes totais; 3,4 a 0,7 log de UFC/g (2,7 log de redução) de *E. coli* e 4,8 para 2,9 log de UFC/g (1,9 log de redução) de *Staphylococcus* coagulase positiva. Notou-se também que as contagens de todos os micro-organismos analisados, no decorrer da maturação, diferiram-se significativamente. Pode-se observar que todas as contagens diminuíram significativamente dos 7 para os 14 dias de maturação (Tabela 2). As amostras do produtor P2 alcançaram o limite aceitável de coliformes totais para o queijo com 72 horas de maturação e o de *Staphylococcus* coagulase positiva com 7 dias. A contagem de *E. coli* manteve-se de acordo com a legislação em todos os

momentos analisados da maturação. Notou-se baixas contagens de *E. coli* desde o início da produção nesse produtor. Além disso, entre o período de 24 horas até os 22 dias de maturação, houve a redução de 4,0 para 2,1 log UFC/g (1,9 log de redução) de coliformes totais, e de 4,0 para <1 log UFC/g (4 log de redução) de *Staphylococcus* coagulase positiva. As amostras do produtor P3 alcançaram o limite de *Staphylococcus* coagulase positiva com 14 dias de maturação, de *E. coli* com 72 horas de maturação e coliformes totais manteve-se de acordo com a legislação, desde o início da produção. Tanto as contagens de coliformes, *E. coli* como *Staphylococcus* tiveram redução de 2 log das contagens das 24 horas até o final da maturação (Tabela 4).

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 micro-organismos indesejáveis. Em estudo realizado por Cardoso et al. (2013) com queijo do Serro, foi observado que as contagens de *Staphylococcus* coagulase positiva tiveram redução de 1 log com 30 dias de maturação e 4 log ao final do período de maturação de 60 dias. A diminuição das cargas microbianas dos indicadores ao longo da maturação pode estar relacionada a competição por nutrientes com as BAL, produção de compostos antimicrobianos pelas BAL, bem como com a redução da umidade, aumento da concentração dos sólidos, como o cloreto de sódio adicionado no início do processo, resultando na redução da a_w (ECK, 1987; FURTADO, LOURENÇO & NETO, 1994; CARIDI et al., 2003; NARDES et al., 2006;).

Nos queijos do produtor P1, os resultados de pH obtidos mostraram um decréscimo significativo ($p < 0,05$) dos valores do leite, pingo, massa e queijo até o tempo de 24 horas, porém a partir desse tempo de maturação, essa diferença não foi mais observada. Nos queijos do produtor P2 notou-se também um decréscimo

significativo ($p < 0,05$) nos valores de pH até o tempo de 48 horas. Entre o queijo maturado por 48 horas e o queijo maturado por 22 dias houve pequeno aumento do valor do pH, porém quando comparados os resultados dos queijos com 24 horas com os queijos com 22 dias de maturação, o valor não alterou significativamente. Os queijos do produtor P3, tiveram comportamentos semelhantes aos observados nos demais produtores: decréscimo significativo ($p < 0,05$) nos valores de pH do início do processo até o queijo com 48 horas de maturação. Entre os períodos de 48 horas e 72 horas houve o aumento significativo ($p < 0,05$) do valor do pH, porém após esse período o pH voltou a decrescer até o tempo de 22 dias. Quando comparados os queijos com 24 horas de maturação aos queijos com 22 dias, observa-se que houve diminuição dos valores de pH. A queda do pH no período de maturação pode estar relacionada a produção de ácidos orgânicos produzidos pelas BAL (FOX & COGAN, 2004; McSWEENEY et al., 2017).

Esse decréscimo do pH até o período de 24 a 48 horas de produção é de se esperar, visto que nesse período há a conversão da lactose para ácido láctico, como consequência do processo fermentativo das BAL iniciadoras adicionadas no processo por meio do soro-fermento “pingo” (GATTI et al, 2014). A diminuição do pH durante a maturação de queijos artesanais brasileiros fabricados com leite cru de vaca também foi observado em outros estudos (SOUZA et al., 2003; CAMPAGNOLLO et al., 2018). Ioanna et al. (2018) também observaram um decréscimo de pH ao longo da maturação em queijo *Cacioricotta*, fabricado com leite cru de búfala de 6,36 (dia 0) para 5,41 (dia 90). Em contrapartida, Dores, Nobrega & Ferreira (2013) observaram que tanto no período das chuvas quanto no período das secas houve um pequeno aumento dos valores de pH do queijo Canastra, ao longo da maturação, armazenado a temperatura ambiente, sendo o aumento de aproximadamente 5,03 para 5,10 (com 29 dias de maturação) no período de chuva e 5,0 para 5,07 no período da seca. Martins et al. (2015) também observaram um aumento significativo de pH ao longo da maturação do queijo do Serro e também atribuíram esse resultado à degradação das proteínas pelas proteases dos micro-organismos presentes no leite e no pingo. Diezhandino et al. (2015) observaram um aumento no pH ao longo da maturação do queijo espanhol *Valdeón* de 5,03 para 5,97 em 30 dias e 6,85 ao final dos 120 dias de maturação,

sugerindo que esse aumento seja devido ao intenso catabolismo das BAL e por reações de desaminação causada pelos fungos (Hayaloglu et al., 2008).

Foi realizado o teste de correlação de Pearson para verificar se os valores de pH e as contagens tiveram correlação ao longo da maturação, ou seja, se o aumento ou a diminuição das contagens estava relacionado ao aumento ou diminuição do pH. Observou-se que em apenas amostras de um produtor houve correlação moderada negativa de pH e contagens, ou seja, à medida que uma variável aumentava, a outra diminuía. Os valores obtidos para pH e contagem de coliforms totais foram: $r = -0,653$ e $p = 0,00$; pH e contagem de *E. coli*: $r = -0,431$ e $p = 0,015$; pH e contagem de *Staphylococcus*: $r = -0,404$ e $p = 0,024$. Por ser um resultado obtido em apenas um produtor, não é possível generalizar esta tendência.

Além das BPF para evitar a contaminação do leite cru, pingo e queijo ao longo do processo, a microbiota como um todo, incluindo as BAL iniciadoras e não iniciadoras, e seus metabólitos presentes no queijo podem ser fatores que interferem significativamente no controle dos patógenos no decorrer da maturação (MONTEL et al, 2014; GATTI et al, 2014). Por serem micro-organismos que conseguem sobreviver melhor que os demais em ambientes hostis, como em baixo pH, pouca disponibilidade de nutrientes, alta concentração de NaCl, temperatura menor do que a ideal, as BAL não iniciadoras são encontradas em maior abundância em queijos maturados após 60 dias de maturação (GATTI, 2014).

Os resultados obtidos mostraram que a maturação foi um fator significativo e muito importante na redução da carga microbiana dos indicadores e patógenos analisados presentes nesse produto. O comportamento do pH diferiu-se de produtor para produtor, porém houve a redução dos valores do começo em relação ao final da maturação. Entretanto, pode-se concluir que apenas a observação dos valores do pH durante a maturação não garante a qualidade microbiológica/sanitária do produto.

É importante ressaltar que todos os produtores participantes do estudo longitudinal são cadastrados no PQMA, e, por isso, são produtores que, a princípio, cumprem as boas práticas de fabricação, de ordenha e controle da saúde animal, devido às inspeções feitas periodicamente pelo órgão regulador, IMA (MINAS GERAIS, 2002). Portanto, a qualidade microbiológica da matéria-prima, aliadas aos procedimentos adequados adotados por cada queijaria, junto ao tempo de maturação, podem ter sido fatores que tornaram os produtos analisados seguros para consumo

antes mesmo do final da maturação, como também observado em outros estudos (FORGRAVE et al., 2016; FUKA et al., 2013; MARTINS et al., 2015).

Com o objetivo de observar a qualidade microbiológica de um maior número de amostras de queijos da região da Canastra e comparar com os resultados satisfatórios obtidos por esse estudo ao longo da maturação, foi realizado o estudo transversal, com queijos coletados após o período de maturação exigido por legislação, tanto de produtores cadastrados como de produtores não cadastrados no PQMA.

5.2. ESTUDO TRANSVERSAL

O estudo transversal avaliou 78 amostras de queijos após o período de 22 dias de maturação, provenientes da Serra da Canastra, de produtores cadastrados e não cadastrados no PQMA. De acordo com os dados obtidos, 38% das amostras de queijo minas artesanal da Canastra atenderam a todos os requisitos microbiológicos exigidos pela legislação. Com isso, 62% do total de produtores não atenderam a pelo menos um requisito da legislação referente aos parâmetros microbiológicos, ou seja, não atenderam a contagem de coliformes totais (19%) e/ou contagem de *E. coli* (18%) e/ou contagem de *Staphylococcus* coagulase positiva (42%) e/ou ausência de *L. monocytogenes* (1%).

Entre os produtores cadastrados no PQMA, 46% atenderam a todos os parâmetros microbiológicos exigidos por legislação; já com relação aos produtores não cadastrados no PQMA, apenas 35% atenderam a todos os parâmetros microbiológicos exigidos, como pode ser observado na Tabela 5. Dentro dos que apresentaram pelo menos um dos parâmetros em desacordo com a legislação, 71% eram produtores que não possuem cadastro no PQMA. Entre os produtores que apresentaram todos os parâmetros em acordo com a legislação vigente, 40% eram produtores cadastrados no PQMA.

Tabela 5: Quantidade de amostras de queijo minas artesanal da Canastra que atenderam ou não a legislação vigente, de acordo com os parâmetros microbiológicos exigidos.

	Atenderam	Não atenderam
Geral	30 (38%)	48 (62%)
Cadastrados no PQMA	12 (46%)	14 (54%)
Não Cadastrados no PQMA	18 (35%)	34 (65%)
Coliformes totais	63 (81%)	15 (19%)
<i>E. coli</i>	64 (82%)	14 (18%)
<i>Staphylococcus coagulase</i> positiva	45 (58%)	33 (42%)
<i>Salmonella</i> spp.	78 (100%)	-
<i>L. monocytogenes</i>	77 (99%)	1 (1%)

PQMA: Programa Queijo Minas Artesanal.

Legislações de referência: 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).

Mesmo com o cadastro dos produtores no PQMA, a porcentagem de produtores que não atendem aos requisitos da legislação ainda é alta. No entanto, as não conformidades foram maiores junto aos produtores que não são cadastrados (Tabela 5), corroborando ainda mais a importância de se adotarem as boas práticas na produção. A implementação de programas voltados a segurança de alimentos em pequenos produtores pode encontrar algumas barreiras como falta de experiência dos colaboradores, restrições financeiras, atitudes ou até mesmo excesso de documentos necessários para implementação e controle dos planos (TAYLOR, 2001, WALKER et al., 2003; CARRASCOSA et al., 2016).

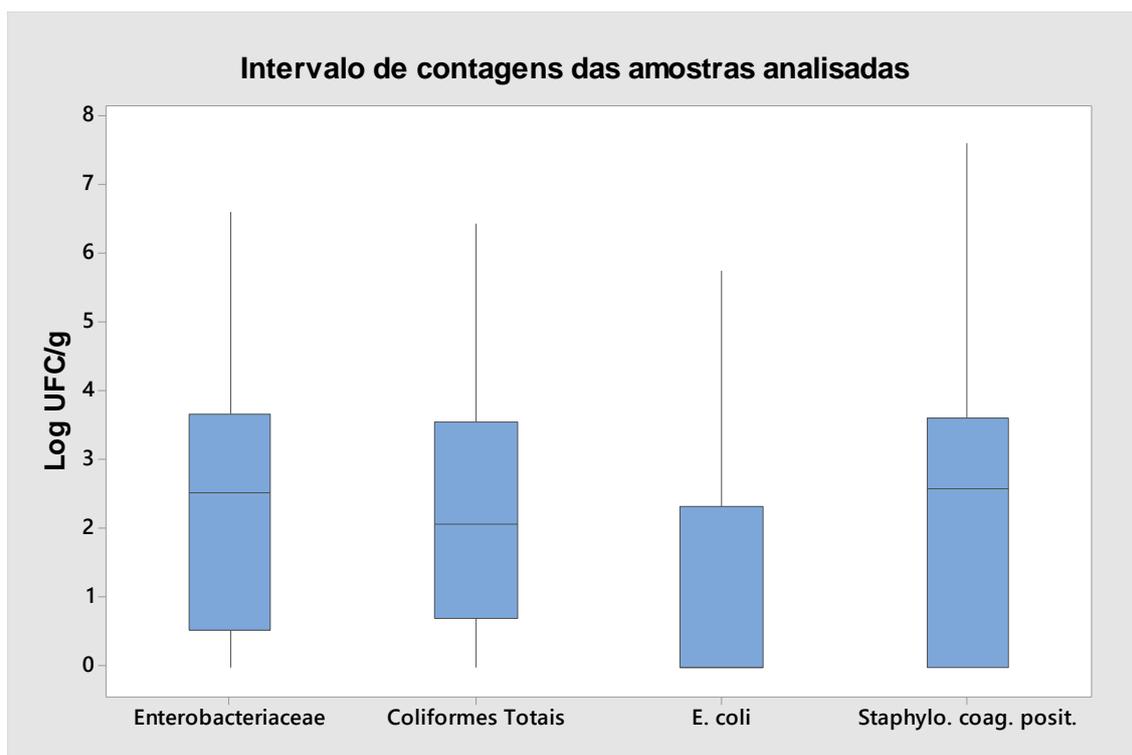
Como observado na Tabela 5, em apenas uma amostra foi detectada *L. monocytogenes* e em nenhuma das amostras foi detectada *Salmonella* spp. A cepa de *L. monocytogenes* isolada do queijo foi também confirmada pela análise de PCR convencional. Em estudo semelhante, Martins et al. (2015) avaliaram 256 queijos do Serro e em uma amostra com 15 dias de maturação a temperatura de refrigeração (± 4 °C) houve a detecção de *Salmonella* spp., 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* spp em nenhuma das 100 amostras de queijo do Serro. Dores, Nobrega & Ferreira (2013) não

detectaram *Listeria* spp. e nem *Salmonella* spp. em nenhuma das 32 amostras analisadas de queijo da Canastra durante os períodos de seca e chuva. PINTO et al. (2009) mostraram que a maturação pelo período de 60 dias para o queijo do Serro (feito em laboratório, com leite cru proveniente do Serro) não foi suficiente para eliminar a *Listeria innocua* que foi inoculada inicialmente no leite em concentrações de $1,0 \times 10^1$, $1,0 \times 10^2$ ou $1,0 \times 10^3$ CFU/mL. No entanto, eles observaram que os queijos coletados dos três produtores rurais da região, previamente selecionadas de acordo com critérios higiênico-sanitários (sanidade do rebanho, BPF e BPO), sem inoculação de bactérias patogênicas, não apresentaram *L. monocytogenes*. Além disso, Morgan et al. (2001) observaram que *L. monocytogenes* sobreviveu após 42 dias de maturação em um tradicional queijo francês feito a partir de leite cru de cabra. Brooks et al. (2012) não observaram *Listeria* spp. nem *Salmonella* spp. em 41 amostras queijos artesanais feitos a partir do leite cru de vaca, cabra e búfalo maturados por 60 dias a temperatura de 1,7 °C, fabricados nos EUA. Guzman-Hernandez et al. (2016) detectaram *Salmonella* spp em duas de 52 amostras de queijo fresco mexicano feito a partir de leite não pasteurizado, contrastando assim os queijos mineiros dos queijos mexicanos.

A presença de *L. monocytogenes* em queijos, embora encontrada em baixa incidência nas amostras analisadas, apresenta perigos para a saúde, principalmente para os grupos de risco (gestantes, recém-nascidos, idosos e imunocomprometidos) (McLAUHLIN et al., 2004). Portanto, deve-se realizar um esforço adicional para evitar que este micro-organismo tenha acesso ao alimento em decorrência de mastite bovina, água contaminada, equipamentos e utensílios mal higienizados (CAMPAGNOLLO et al., 2018). É de grande importância a criação de campanhas educativas para informar aos consumidores do grupo de risco sobre os riscos de se consumir queijos feitos com leite cru, como ocorre em países como Estados Unidos, Canadá e França (NAP, 2013; HEALTH CANADA, 2013; FDA, 2018; LE MINISTÈRE DE L'AGRICULTURE ET DE L'ALIMENTATION, 2019; CDC, 2019). Informativos em embalagens e rótulos desse tipo de produto também são medidas que podem ser adotadas e, com isso, o consumidor terá a oportunidade de tomar decisões com mais clareza em relação aos produtos que estão consumindo.

Com o intuito de observar o intervalo de contagens dos demais micro-organismos analisados nos queijos maturados, foram feitos os gráficos de boxplot presentes na Figura 8.

Figura 8: Intervalo de contagens em log UFC/g dos micro-organismos analisados nas amostras de queijo minas artesanal da Canastra.

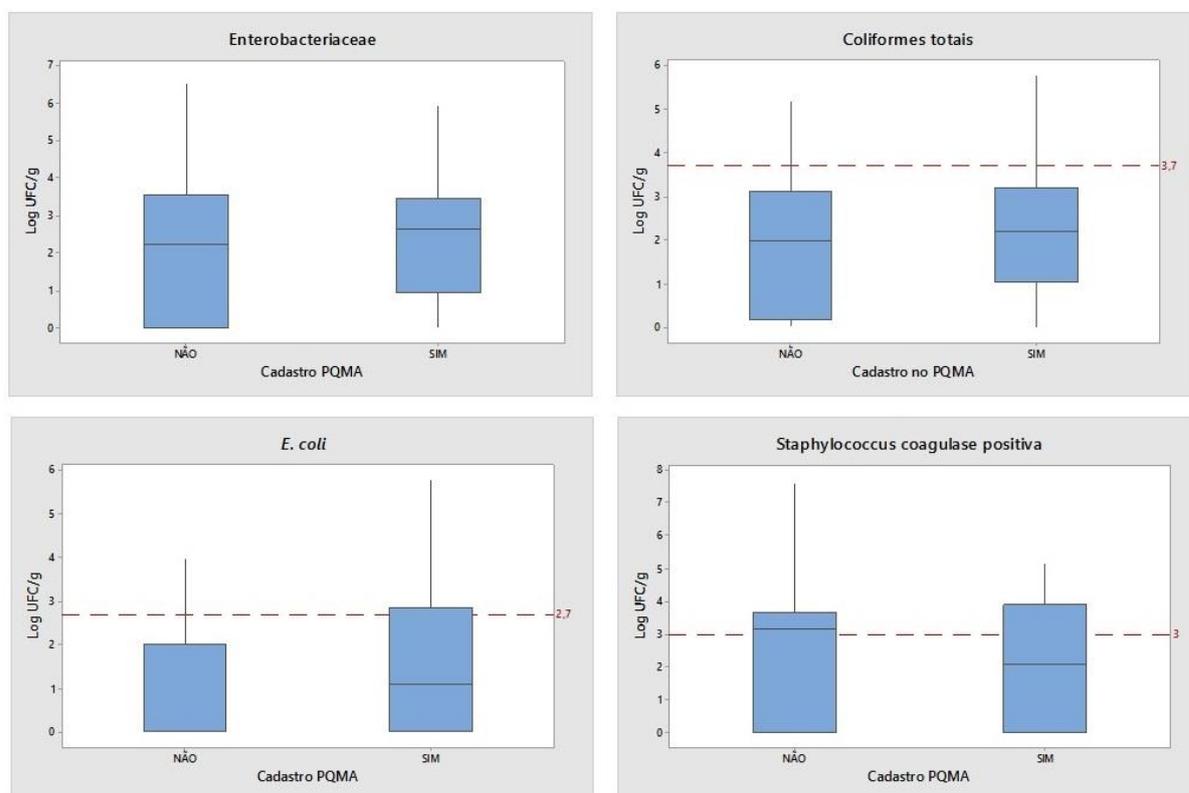


*Devido à escala logarítmica, para que fosse possível a plotagem dos dados com ausência de colônias nas placas (abaixo do limite de detecção do método), foi adotado o log (1) que é igual a zero.

Pode-se observar, pela Figura 8, que houve grande variação nas contagens de todos os micro-organismos avaliados nas amostras provenientes das 78 produtores da Canastra. As contagens das bactérias da família Enterobacteriaceae ficaram entre <1 e 6,6 log UFC/g, coliformes totais entre <1 e 6,4 log UFC/g, *E. coli* entre <1 e 5,8 log UFC/g e *Staphylococcus* coagulase positiva entre <1 e 7,6 log UFC/g.

Os resultados das análises microbiológicas foram estratificados entre produtores cadastrados e não cadastrados no PQMA, com o intuito de observar a distribuição das contagens entre esses grupos e averiguar possíveis benefícios da associação ao programa, se o cadastro influenciou na contagem microbiana no final da maturação. A distribuição dos dados microbiológicos de contagens pode ser observada na Figura 9.

Figura 9: Intervalo de contagens obtidas para cada micro-organismo de acordo com o cadastro no PQMA.



A linha pontilhada representa o limite estabelecido pela legislação: Coliformes totais ($5,0 \times 10^3$ UFC/g ou 3,7 log UFC/g); *E. coli* ($5,0 \times 10^2$ UFC/g ou 2,7 log UFC/g); *Staphylococcus coagulase positiva* ($1,0 \times 10^3$ UFC/g ou 3,0 log UFC/g).

*Devido à escala logarítmica, para que fosse possível a plotagem dos dados com ausência de colônias nas placas (abaixo do limite de detecção do método), foi adotado o log (1) que é igual a zero.

Por essa estratificação dos resultados, percebe-se que não houve grandes diferenças entre as contagens obtidas nas análises dos produtores cadastrados e não cadastrados no PQMA. Entretanto, pode-se notar que as maiores contagens de *Staphylococcus coagulase positiva* foram obtidas em queijos provenientes de produtores não cadastrados no PQMA. Os produtores que não possuem o cadastro não têm o aporte e apoio dos órgãos reguladores, como os produtores que fazem parte do programa. No entanto, apesar do cadastramento do produtor nesse programa, ainda há melhorias a serem feitas na produção dos queijos, de forma geral. Além disso, vale ressaltar que o número de produtores rurais cadastrados no PQMA ($n=26$) que participaram desse estudo é menor do que os produtores não cadastrados ($n=52$). Mesmo o número de conformidades sendo maior entre os produtores cadastrados, por essa análise, evidencia-se a não padronização dos produtos, visto

que apenas pelo cadastramento do produtor, não há conclusão de que o produto atende a todos os parâmetros da legislação. A elevada quantidade de amostras que apresentaram algum dos quesitos em desacordo com as normas exigidas pode refletir condições higiênicas não adequadas, implantação e implementação incompletas de boas práticas tanto no campo quanto na produção dos queijos, necessidade de conscientização, ou a falta de apoio do órgão regulador, no que diz respeito a auditorias nessas queijarias, bem como em cursos para mostrar a importância da gestão de qualidade na produção desse tipo de alimento (IOANNA et al., 2018; KOUSTA et al., 2010; FROZI et al., 2015).

As contagens de Enterobacteriaceae obtidas nas análises estiveram em um intervalo entre <1 (abaixo do limite de detecção do método) e $6,6 \log \text{ UFC/g}$; sendo que 75% das amostras obtiveram valores entre <1 e $3,7 \log \text{ UFC/g}$, e 50% do total dos valores obtidos (representados pela mediana) ficaram abaixo de $2,5 \log \text{ UFC/g}$. A Figura 8 mostra que 25% das amostras obtiveram valores maiores que $3,7 \log \text{ UFC/g}$. Em estudo realizado na Espanha para avaliar o comportamento das Enterobacteriaceae durante o processo de maturação de um tradicional queijo artesanal, *San Simon*, também fabricado com leite cru, Tornadijo et al. (2001) observaram altas contagens de Enterobacteriaceae, chegando a contagens entre $4,5$ e $5,5 \log \text{ UFC/g}$ em 4 semanas de maturação do queijo. Ao final da maturação, com 6 semanas, a média de contagem caiu para $4,0$ e $2,5 \log \text{ UFC/g}$, assemelhando-se ao intervalo de contagem encontrado nesse estudo para a metade das amostras. Tabla et al. (2016) observaram em suas amostras de queijo semi-duro, feito com leite cru de cabra, contagens de Enterobacteriaceae de aproximadamente $3,7 \log$ de UFC/g no queijo com 30 dias de maturação, assemelhando-se a este estudo, e ao final da maturação (60 dias) contagens de aproximadamente $2,0 \log \text{ UFC/g}$.

Não há limite estabelecido por legislação para contagem de Enterobacteriaceae. No entanto, de acordo com dados apresentados na Figura 9, observa-se que 75% das amostras, tanto de produtores cadastrados no PQMA, como de não cadastrados, obtiveram contagens inferiores a $3,7 \log \text{ UFC/g}$ (ou $5,0 \times 10^3 \text{ UFC/g}$). Havendo necessidade da adição desse indicador de higiene em nova legislação, o limite de $5,0 \times 10^3 \text{ UFC/g}$ poderia ser adotado. Estas bactérias, além de serem indicadores de higiene, são responsáveis pela produção de alguns compostos que podem alterar as características sensoriais do queijo, tais como aminas biogênicas (putrescina, histamina, espermidina), ácido acético, e compostos como

etanol, 2,3-butanodiona, 3-hidroxi-2-butanona e acetona (CHAVES-LOPEZ et al., 2006).

Vale ressaltar que para a determinação de critérios microbiológicos com limites mínimos e máximos são necessários conhecimentos técnico-científicos como fatores de virulência dos micro-organismos; metabólitos produzidos; sensibilidade a antibióticos, além de levar em consideração a maneira com que o produto será consumido (queijo = cru, sem tratamento térmico) para que o consumidor tenha a garantia que esteja consumindo um alimento seguro, e que os níveis sejam aceitáveis mundialmente, sem prejudicar o comércio internacional do produto, caso houver essa possibilidade (CODEX, 2009; PortFIR, 2017).

De acordo com dados apresentados na Figura 8, as contagens de coliformes totais estiveram em um intervalo entre <1 e $6,4 \log \text{ UFC/g}$, sendo que a maior parte de amostras (75%) obtiveram valores entre <1 e $3,6 \log \text{ UFC/g}$, onde 50% dos valores obtidos ficaram abaixo de $2,1 \log \text{ UFC/g}$. Na Figura 9, pode-se observar que pelo menos 75%, tanto dos queijos provenientes de produtores cadastrados como os não cadastrados, obtiveram os limites aceitos por legislação pós maturação. Portanto, esse resultado demonstra que o limite estabelecido pela legislação já é atendido pela maioria dos produtores e que um esforço deve ser realizado pelos demais produtores para chegarem ao valor regulamentado.

As contagens de *E. coli* estiveram em um intervalo entre <1 e $5,8 \log \text{ UFC/g}$, sendo que 75% das amostras obtiveram valores entre <1 e $2,3 \log \text{ UFC/g}$, de acordo com a Figura 8. Ressalta-se que 50% das amostras tiveram contagem abaixo do limite detectável ($<1 \log \text{ UFC/g}$) nos produtores não cadastrados no PQMA, e 50% dos queijos de produtores cadastrados obtiveram contagens entre <1 e $1,0 \log \text{ UFC/g}$ de acordo com a Figura 9. É possível observar na Figura 9 que pouco mais de 75% dos produtores cadastrados não atenderam ao limite da legislação para *E. coli*, que é $5,0 \times 10^2 \text{ UFC/g}$, equivalente a $2,7 \log \text{ UFC/g}$. No entanto, quando observa-se no geral, mais de 75% das amostras analisadas atenderam ao limite da legislação para essa bactéria, portanto, é factível que os 18% que estão com contagens acima do aceitável adotem práticas de melhoria na produção para adequação à legislação.

A *E. coli* pode estar presente devido à água utilizada de má qualidade, higienização precária das mãos dos manipuladores, práticas de higiene inadequadas

na ordenha e dos utensílios utilizados (SILVA et al., 2011). Dores et al. (2013) observaram contagens de coliformes de 2,0 log UFC/g e *E. coli* 1,5 log UFC/g para o queijo minas artesanal da Canastra analisados após os 22 dias de maturação a temperatura ambiente. Portanto, seus dados corroboram os valores observados no presente estudo. A análise de *E. coli* é um importante indicativo de qualidade e segurança, pois representa contaminação de origem fecal e sua presença representa um fator de risco para o consumidor, pois algumas estirpes podem ser patogênicas e causar infecção de origem alimentar (CROXEN et al., 2013; FRANCO & LANDGRAF, 2008).

As contagens obtidas nas análises de *Staphylococcus* coagulase positiva estiveram em um intervalo entre <1 e 7,6 log UFC/g, onde 75% das amostras obtiveram valores entre <1 e 3,6 log UFC/g, de acordo com a Figura 8. Já o gráfico do intervalo de contagem de *Staphylococcus* coagulase positiva da Figura 9 mostrou que em ambos os casos, produtores cadastrados ou não, mais de 25% dos produtores não atenderam ao limite estabelecido. No caso das amostras dos produtores não cadastrados, mais de 50% das mesmas ultrapassaram o limite estabelecido por legislação que é de $1,0 \times 10^3$ UFC/g, equivalente a 3,0 log UFC/g. Portanto, 42% (n=33) das amostras ultrapassaram a contagem máxima permitida. Sendo assim, esse micro-organismo foi responsável pelo maior número de não-conformidades neste estudo. Além disso, a ampla distribuição (<1 e 7,6 log UFC/g) indica a grande heterogeneidade entre os produtores e que um maior esforço deve ser despendido pelos agentes reguladores e produtores para redução das contagens desse micro-organismo.

Borelli et al. (2006) avaliaram o comportamento de cepas de *Staphylococcus* enterotoxigênicas e o de outros micro-organismos indicadores durante a produção de queijo minas artesanal da Canastra e observaram altas contagens *S. aureus* (6,0 log UFC/g) e *Staphylococcus* spp. (6,3 log UFC/g) nos queijos das fazendas analisadas. Altas contagens de *S. aureus* podem indicar mastite no rebanho, seja clínica ou subclínica, e que boa parte dos produtores não adota os cuidados necessários para redução deste problema (JOHLER et al., 2018; HOQUE et al., 2018). Nos Estados Unidos, em estudo realizado por Brooks et al. (2012), foi observado que apenas uma amostra de queijo fabricado com leite cru de vaca, e maturado por 60 dias, que a contagem de *S. aureus* estava acima de $3,0 \times 10^4$ UFC/g. Entretanto, este micro-organismo não estava presente nas demais amostras. Este resultado contrasta com

a realidade do queijo artesanal brasileiro, como observado neste e em vários outros estudos citados anteriormente, em que a detecção de *S. aureus* é bastante comum.

Perin et al. (2017) avaliaram as características microbiológicas de queijo da Canastra e observaram contagens de *Staphylococcus* coagulase positiva entre 2,61 e 4,98 log UFC/g, *E. coli* entre <1 e 2,52 log UFC/g e coliformes totais entre 0,6 e 3,37 log UFC/g, assemelhando com os resultados obtidos nesse trabalho. Nesse mesmo estudo realizado por Perin et al. (2017), foi observado que altas contagens de *Staphylococcus* coagulase positiva no queijo do Serro (5,68 log UFC/g) e no queijo de Campo das Vertentes (6,09 log UFC/g), assemelhando-se a algumas amostras desse estudo, ao qual atribuiu as altas contagens ao excesso de manipulação que ocorre durante a produção, a exemplo da etapa de prensagem manual.

O limite atual para *Staphylococcus* coagulase positiva tem sido questionado pelos produtores em diversos meios como em reuniões realizadas pela Rede de Pesquisa em Queijos Artesanais Brasileiros (REPEQUAB) em São Paulo, no Centro de Pesquisas em Alimentos ("Food Research Center – FoRC) e no 1º Seminário Científico do Queijo Minas Artesanal realizado durante o Festival Queijo Minas Artesanal realizado em São Roque de Minas em junho de 2018, já que, segundo os produtores brasileiros, o limite para *Staphylococcus* coagulase positiva de queijos franceses produzidos de forma semelhantes aos queijos brasileiros é de $1,0 \times 10^5$ UFC/g e aqui no Brasil é $1,0 \times 10^3$ UFC/g (MINAS GERAIS, 2002; MINAS GERAIS, 2008; EUROPEAN UNION, 2005). Vale ressaltar que se um lote determinado houver contagens de *Staphylococcus* coagulase positivas superiores a $1,0 \times 10^5$ UFC/g, o regulamento europeu exige a realização de teste de toxina estafilocócica no queijo.

Os queijos artesanais franceses, tais como *Soumaintrain*, *Saint-Marcellin*, *Maroilles*, *Abbaye de Belloc*, *Reblochon* e *Livarot* assemelham-se aos queijos artesanais brasileiros no modo de produção: fabricados com leite cru, por pequenos produtores de maneira artesanal e maturados em prateleiras de madeira (DUGAT-BONY et al., 2016; MARIANI et al., 2007; FEURER et al., 2004; LARPIN et al., 2006). Porém, em estudo realizado por Isidoro (2019), comparando queijos da América do Norte e os europeus, incluindo queijos franceses, com queijo minas da Canastra, concluiu-se que tanto a microbiota quanto o pH desses queijos diferem-se significativamente entre si. Portanto, para a alteração de limites de *Staphylococcus*

coagulase positiva de queijos minas artesanais são necessários mais estudos que comprovem que essa matriz não apresenta riscos para o consumidor, tais como expressão de fatores de virulência como a expressão dos genes de enterotoxinas frente as características intrínsecas do produto, como o pH, a_w e salinidade. O cumprimento de regulamentos/limites auxilia na diminuição de doenças transmitidas pelo leite e derivados e foi comprovado por estudos realizados por Olsen et al. (2000) onde mostrou-se que, em 1938, 25% dos surtos que ocorreram estavam ligados ao leite e seus derivados láteos, entretanto com a criação de normas, parâmetros, legislações, essa taxa caiu para menos de 1% dos surtos (NAP, 2003).

Com o intuito de verificar se os parâmetros de pH ou a_w mostravam por si só se as amostras estavam em acordo ou não com a legislação, os resultados foram estratificados em dois grupos: grupo das amostras que atenderam a todas as exigências microbiológicas da legislação e grupo das amostras que não atenderam a pelo menos uma exigência da legislação. Os resultados foram submetidos ao teste *t de Student* para duas amostras independentes para observar se houve diferença significativa entre os resultados dos dois grupos, tanto para os valores de pH quanto para a_w , como pode ser observado na Tabela 6.

Tabela 6: Valores obtidos de pH e a_w das amostras de queijo minas artesanal da Canastra.

	pH (Média±DP)	a_w (Média±DP)
Amostras que atenderam aos limites	5,46±0,25 ^a	0,91±0,04 ^a
Amostras que não atenderam aos limites	5,54±0,24 ^a	0,92±0,04 ^a

^a Médias na mesma coluna seguidas de letras iguais não diferem entre si ($p \geq 0,05$ – Teste de Tukey). DP=Desvio Padrão.

Não houve diferença significativa de pH e de a_w entre as amostras que atenderam e não atenderam a legislação e, por esse motivo, é possível concluir que o pH não é um parâmetro, nesse caso de queijos artesanais da Canastra, controlador de crescimento de indicadores ou pela presença/ausência de patógenos exigidos pela legislação. Essa conclusão está em acordo com o estudo longitudinal, ao qual o controle dos indicadores e patógenos não foi correlacionado aos valores de pH obtidos ao decorrer da maturação. Em estudo realizado por Silva (2007), a média de pH do

queijo minas artesanal da Canastra foi de 5,24, assemelhando-se a alguns dos valores encontrados nesse estudo. Dores, Nobrega & Ferreira (2013) avaliaram o queijo da Canastra e observaram valores menores de pH quando comparados a esse estudo: média de 5,05 em ambos os períodos de seca e chuva. Já para a a_w , foram observados valores semelhantes a algumas amostras obtidas nesse estudo: no período de seca a média obtida por eles foi de 0,96 e no período das secas a média foi de 0,97. Martins et al. (2015), avaliaram o queijo minas artesanal do Serro e encontraram valores de pH 4,7 e 4,9 após 17 dias de maturação no período de seca e chuva, respectivamente, e a_w 0,96 e 0,98 nos mesmos períodos, portanto, o pH do queijo do Serro é menor que o da Canastra, em contrapartida, a atividade de água é ligeiramente maior. Brooks et al. (2012) observaram valores de pH entre 5,2 e 6,3 e a_w de 0,88 e 0,95, de queijos maturados duros e semi-duros produzidos com leite cru de vaca nos EUA. As médias para o pH foram 5,73 e para a_w 0,92, ao qual o último parâmetro obteve média semelhante ao estudo presente. Essa pequena diferença com relação aos valores de pH, sendo os valores dos queijos dos EUA maiores, pode estar relacionada com o tempo maior de maturação comparado aos queijos mineiros (ISIDORO, 2019). Tabla et al. (2016) avaliaram queijo espanhol de cabra feito a partir de leite cru e observaram valores médios de pH de 5,12 com 30 dias de maturação e 5,21 com 60 dias de maturação, sendo pouco abaixo dos valores obtidos nesse estudo.

Os resultados obtidos nesse estudo transversal mostraram que o cadastro no PQMA não foi um fator conclusivo para o cumprimento da legislação e que os produtores não cadastrados necessitam ainda mais de boas condições higiênicas para a produção de seus queijos.

Além disso, por ser um trabalho com um número significativo de amostras, a revisão dos parâmetros microbiológicos da legislação para queijos artesanais pode levar em consideração os dados aqui obtidos.

Por fim, esse estudo auxilia na compreensão da realidade dos produtores rurais de queijo minas artesanal da Canastra, sob o ponto de vista microbiológico, devido ao número elevado de amostras analisadas e também pelo comportamento dos microorganismos indicadores e patógenos durante a maturação desse produto, mostrando a heterogeneidade entre os produtores.

6. CONCLUSÕES

Os experimentos mostraram que as amostras analisadas durante a maturação, provenientes de produtores cadastradas no PQMA, foram satisfatórias, do ponto de vista microbiológico, antes dos 22 dias de maturação e que não há correlação entre o pH e as contagens dos micro-organismos analisados. Entretanto, no estudo realizado pós maturação, foi observado um alto número de não conformidades das amostras tanto de produtores cadastrados como de não cadastradas no PQMA. Em algumas amostras foram observadas altas contagens de Enterobacteriaceae e/ou coliformes totais e/ou *E. coli* e/ou de *Staphylococcus* coagulase positiva. Em nenhuma amostra foi detectada *Salmonella* spp e *L. monocytogenes* foi detectada em uma amostra. Os valores obtidos de pH e a_w , estratificados em grupos que atendem e não atendem a legislação, não mostraram diferença significativa. Contudo, o cadastro no PQMA não foi fator conclusivo para o cumprimento da legislação em grande parte das amostras. Portanto, são necessários mais esforços dos produtores, cadastrados e não cadastrados, bem como dos órgãos reguladores para melhoria dos indicadores microbiológicos. Por fim, pelo elevado número de amostras analisadas, os dados desse estudo podem ser usados para compreender a realidade dos produtores sob o ponto de vista microbiológico e também para o fomento de dados para revisão dos parâmetros da legislação para esse tipo de produto.

REFERÊNCIAS

- ALEMDAR, S.; AGAOGLU, S. Survival of *Salmonella* Typhimurium during the ripening of Herby cheese (Otlü Peynir). **Journal of Food Safety**, v. 30, p. 526–536, 2010.
- 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*. 2009. 112p. Dissertação (Mestre em Tecnologia de Alimentos) - Faculdade de Engenharia de Alimentos da Universidade Estadual de Campinas.

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

ASSOCIAÇÃO DOS PRODUTORES DE QUEIJO CANASTRA (APROCAN). Nota da APROCAN sobre certificação de registro de Indicação Geográfica. Disponível em: <http://www.sertaobras.org.br/blog/2011/12/20/nota-da-aprocan-sobre-certificacao-de-registro-de-indicacao-geografica/>. Acesso em: 12 de jul. 2017.

BORELLI, B. M. Caracterização das bactérias lácticas, leveduras e das populações de *Staphylococcus* enterotoxigênicos durante a fabricação do queijo curado produzido na Serra da Canastra-MG. 2006. 119p. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas) - Universidade Federal de Minas Gerais, 2006.

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.

BOSS, R.; COSANDEY, A.; LUINI, M; ARTURSSON, K.; BARDIAU, M.; BREITENWIESER, F.; HEHENBERGER, E.; LAM, T.; MANSFELD, M.; MICHEL, A.; MÖSSLACHER, G.; NASKOVA, J.; NELSON, S.; PODPEČAN, O.; RAEMY, A; RYAN, E.; SALAT, O.; ZANGERL, P.; STEINER, A.; GRABER. H.U. Bovine *Staphylococcus aureus*: Subtyping, evolution, and zoonotic transfer. **Journal of Dairy Science**, v. 99, p. 515-528, 2016.

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.

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. 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. 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. 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. 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. 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. 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. 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 da Terra ou Manteiga de Garrafa; Queijo de Coalho e Queijo de Manteiga. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 26 junho de 2001.

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. 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: 15 jul. 2018.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 12, de 02 de Janeiro de 2001. Aprova o regulamento técnico sobre padrões microbiológicos para alimentos. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 10 de janeiro de 2001. Seção 1.

BRASIL. Ministério da Saúde. Surtos de Doenças Transmitidas por Alimentos no Brasil. Disponível em: <http://portalarquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2018/janeiro/17/Apresentacao-Surtos-DTA-2018.pdf>. Acesso em: 17 set. 2018.

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: 18 jul. 2019.

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.

BRENNER, D. J.; FARMER III, J. J. Family of Enterobacteriaceae. In: BRENNER, D. J.; KRIERG, N. R. & STALEY, J. T. (Eds), *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, ed. 2, v. 2, p. 587-607, 2005.

BROOKS, J. C.; MARTINEZ, B.; STRATTON, J.; BIANCHINI, A.; KROKSTROMB, R.; HUTKINS, R. Survey of raw milk cheeses for microbiological quality and prevalence of foodborne pathogens. **Food Microbiology**, v. 31, p.154-158, 2012.

CAMPAGNOLLO, F. B.; MARGALHO, L. P.; KAMIMURA, B. A.; FELICIANO, M. D.; FREIRE, L.; LOPES, L. S.; ALVARENGA, V. O.; CADAVEZ, V. A. P.; GONZALES-BARRON, U.; SCHAFFNER, D. W.; SANT'ANA, A. S. Selection of indigenous lactic acid bacteria presenting anti-listerial activity, and their role in reducing the maturation period and assuring the safety of traditional Brazilian cheeses. **Food Microbiology**, v. 73, p. 288-297, 2018.

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.
- CARIDI, A. *et al.* Ripening and seasonal changes in microbial groups and in physico-chemical properties of the ewes' cheese Pecorino del Poro. **International Dairy Journal**, v. 13, p. 191-200, 2003.
- CARMO, S. L.; DIAS R. S.; LINARDI, V. R.; SENA M. J.; SANTOS D. A.; FARIA, M. E.; PENA, E. C.; JETT M.; HENEINE L. G. Food poisoning due to enterotoxigenic strains of *Staphylococcus* present in Minas cheese and raw milk in Brazil. **Food Microbiology**, v. 19, p. 9-14, 2002.
- CARRASCOSA, C.; MILLÁN, R.; SAAVEDRA, P.; JABER, J. R.; RAPOSO, A.; SANJUÁN, E. Identification of the risk factors associated with cheese production to implement the hazard analysis and critical control points (HACCP) system on cheese farms. **Journal of Dairy Science**, v. 99, p. 2606-2616, 2016.
- CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. *Listeria*, 2018c. Disponível em: <https://www.cdc.gov/listeria/index.html>. Acesso em: 14 set. 2018.
- CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. Raw (Unpasteurized) Milk. Disponível em: <https://www.cdc.gov/features/rawmilk/index.html>. Acesso em: 18 jul. 2019.
- CHAVES LOPEZ, C.; DE ANGELIS, M.; MARTUSCELLI, M.; SUZZI, G. Characterization of the Enterobacteriaceae isolated from an artisanal Italian ewe's cheese (Pecorino Abruzzese). **Journal of Applied Microbiology**, v.101, i. 2, p. 353-60, 2006.
- CODEX GENERAL STANDARD FOR CONTAMINANTS AND TOXINS IN FOOD AND FEED. CODEX STAN 193-1995. Adopted 1995; Revised 1997, 2006, 2008, 2009; Amended 2009. Disponível em: http://www.fao.org/fileadmin/user_upload/livestockgov/documents/1_CXS_193e.pdf. Acesso em: 20 jul. 2019.
- CROXEN, M. A.; LAW, R. J.; SCHOLZ, R.; KRISTIE M. KEENEY K. M.; MARTA WLODARSKA, M.; FINLAY, B. B. Recent Advances in Understanding Enteric Pathogenic *Escherichia coli*. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 26, n. 4, p. 822–880, 2013.

- 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; LA STORIA, A; STELLATO, G; GATTI, M; ERCOLINI, D. A selected core microbiome drives the early stages of three popular Italian cheese manufactures. **PLoS ONE**, v. 9, i. 2, 2014.
- DELBES, C.; ALOMAR, J.; CHOUGUI, N.; MARTIN, J. F.; MONTEL, M. C. *Staphylococcus aureus* growth and enterotoxin production during the manufacture of uncooked, semihard cheese from cows' raw milk. **Journal of Food Protection**, v. 69, p. 2161-2167, 2006.
- DIEZHANDINO, I.; FERNÁNDEZ, D.; GONZÁLEZ, L.; MCSWEENEY, P. L. H.; FRESNO, J. M. Microbiological, physico-chemical and proteolytic changes in a Spanish blue cheese during ripening (Valdeón cheese). **Food Chemistry**, v. 168, p. 134–141, 2015.
- DORES, M. T. Queijo Minas Artesal da Canastra maturado a temperatura ambiente e sob refrigeração. 2007. 103p. Dissertação (Magister Scientiae em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Universidade Federal de Viçosa.
- 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.
- DUGAT-BONY, E. et al. Highlighting the microbial diversity of 12 French cheese varieties. **International Journal of Food Microbiology**, v. 238, p. 265–273, 2016.
- D'AMICO, D. J.; DONNELLY, C. W. Microbiological quality of raw milk used for small-scale artisan cheese production in Vermont: Effect of farm characteristics and practices. **Journal of Dairy Science**, v. 93, p.134–147, 2010.
- ECK, A. O queijo. Lisboa: Publicações Europa-América, 1987. Coleção EUROAGRO, ed. 137.024/5.141, v. 1.
- EM – Estado de Minas. Queijo mineiro é premiado na França. Disponível em: https://www.em.com.br/app/noticia/economia/2017/06/14/internas_economia,876364/queijo-mineiro-e-premiado-na-franca.shtml. Acesso em: 02 de jul. de 2019.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA. Anuário do Leite de 2019. Disponível em: <http://www.embrapa.br/gado-de-leite>. Acesso em: 18 jul. 2019.

EMPRESA DE ASSISTÊNCIA TÉCNICA E EXTENSÃO RURAL DE MINAS GERAIS – EMATER-MG. O Programa. 2002. Disponível em: http://www.emater.mg.gov.br/portal.cgi?flagweb=site_tpl_queijo&id=3299. Acesso em: 14 set. 2018.

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. Acesso em: 14 set. 2018.

EMPRESA DE ASSISTÊNCIA TÉCNICA E EXTENSÃO RURAL DE MINAS GERAIS – EMATER-MG. O Programa. Disponível em: http://www.emater.mg.gov.br/portal.cgi?flagweb=site_tpl_queijo&id=3299. Acesso em: 24 jun. 2017.

EMPRESA DE ASSISTÊNCIA TÉCNICA E EXTENSÃO RURAL DE MINAS GERAIS – EMATER-MG. Guia Técnico para Implantação de Boas Práticas de Fabricação em Unidades Produtoras de Queijo Minas Artesanal. Queijo Minas Artes - Guia Técnico Boas Práticas Fabricação em Unidades Produção do Queijo Minas Artes.2009. Disponível em: <http://www.emater.mg.gov.br>. Acesso em: 25 jul. 2019.

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: 14 de set. 2018.

EUROPEAN UNION COMISSION. COMMISSION REGULATION (EC) No 2073/2005 of 15 November 2005 on microbiological criteria for foodstuffs. 2005.

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.

FEURER, C.; VALLAEYS, T.; CORRIEU, G.; IRLINGER, F. Does smearing inoculum reflect the bacterial composition of the smear at the end of the ripening of a

french soft, redsmear cheese? **Journal of Dairy Science**, v. 87, p. 3189–3197, 2004.

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.

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. The Dangers of Raw Milk: Unpasteurized Milk Can Pose a Serious Health Risk. Disponível em: <https://www.fda.gov/food/buy-store-serve-safe-food/dangers-raw-milk-unpasteurized-milk-can-pose-serious-health-risk>. Acesso em: 19 jul. 2019.

FOOD SAFETY NEWS. More ill in *Listeria*, *E. coli* outbreaks linked to raw milk cheese. Disponível em: <https://www.foodsafetynews.com/2019/05/more-ill-in-listeria-e-coli-outbreaks-linked-to-raw-milk-cheese/>. Acesso em: 19 jul. 2019.

FORGRAVE, R.; DONAGHY, J. A.; FISHER, A.; ROWE, M. T. Survival kinetics of *Mycobacterium bovis* during manufacture and ripening of raw milk Cheddar and Caerphilly cheese produced on a laboratory-scale. **Journal of Applied Microbiology**, v. 121, p. 1457-1468, 2016.

FOX, P. F. Cheese: chemistry, physics and microbiology. General aspects, London U. K. Chapman e Hall, v. 1, ed. 2, p. 601, 1993.

FOX, P. F.; COGAN, T.M. Factors that affect the quality of cheese. Academic press, v. 1, ed. 2, 2004.

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

FROZI, J. B.; DOMINGUES, J. R.; ESPER, L. M. R.; DA ROSA, J. M. C.; DA COSTA SILVA, A. L.; GONZALEZ, A.G.M. Survival of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157:H7 in Minas frescal cheese. **Food Science and Technology**, v.35, p. 108-114, 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.

FUKA, M. M.; WALLISCH, S.; ENGEL, M.; WELZL, G.; HAVRANEK, J.; SCHLOTTER, M. Dynamics of bacterial communities during the ripening process of different Croatian cheese types derived from raw ewe's milk cheeses. **PLoS ONE**, v. 8, i. 11, 2013.

- GATTI, M.; BOTTARI, B.; LAZZI, C.; NEVIANI, E.; MUCCHETTI, G. Invited review: Microbial evolution in raw-milk, long-ripened cheeses produced using undefined natural whey starters. **Journal of Dairy Science**, v.97, p.573–591, 2014.
- GUERREIRO, P. K.; MACHADO, M. R. F.; BRAGA, G. C.; GASPARINO, E.; FRANZENER, A. S. M. Qualidade microbiológica de leite em função de técnicas profiláticas no manejo de produção. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 29, n. 1, p. 216-222, 2005.
- GUZMAN-HERNANDEZ, R.; CONTRERAS-RODRIGUEZ, A.; HERNANDEZ-VELEZ, R.; PEREZ-MARTINEZ, I.; LOPEZ-MERINO, A.; ZAIDI, M. B.; ESTRADA-GARCIA, T. Mexican unpasteurised fresh cheeses are contaminated with *Salmonella* spp., non-O157 Shiga toxin producing *Escherichia coli* and potential uropathogenic *E. coli* strains: A public health risk. **International Journal of Food Microbiology**, v. 237, p.10–16, 2016.
- GRABER, H. U.; NASKOVA, J.; STUDER, E.; KAUFMANN, T.; KIRCHHOFER, M.; BRECHBÜHL, M.; SCHAEREN, W.; STEINER, A.; FOURNIER, C. Mastitis-related subtypes of bovine *Staphylococcus aureus* are characterized by different clinical properties. **Journal of Dairy Science**, v. 92, p. 1442-1451, 2009.
- G1 Sul de Minas. Queijos de MG conquistam 50 medalhas em concurso mundial na França. Disponível em: <https://g1.globo.com/mg/sul-de-minas/minas-dos-queijos/noticia/2019/06/04/queijos-de-mg-conquistam-serie-de-premios-em-concurso-mundial-na-franca.ghtml>. Acesso em: 02 de jul. de 2019.
- G1 Centro-Oeste – MG. Queijo feito na Serra da Canastra conquista premiação internacional. Disponível em: <http://g1.globo.com/mg/centro-oeste/noticia/2015/06/queijo-feito-na-serra-da-canastra-conquista-premiacao-internacional.html>. Acesso em: 02 de jul. de 2019.
- HAYALOGLU, A. A., BRECHANY, E. Y., DEEGAN, K. C., & MCSWEENEY, P. L. H. Characterization of the chemistry, biochemistry and volatile profile of Kufllu cheese, a mould-ripened variety. **LWT – Food Science and Technology**, v. 41, p.1323–1334, 2008.
- HEALTH CANADA. Raw or unpasteurized milk. Disponível em: <https://www.canada.ca/en/health-canada/services/milk-infant-formula/raw-or-unpasteurized-milk.html?wbdisable=true>. Acesso em: 19 jul. 2019.
- HHAZLLANI, V. K. Book Detail Page Dairy Chemistry and Animal Nutrition. 1st ed. Delhi: Manglam Publishers & Distributors.; 2008.

- HOQUE, M. N.; DASA, Z. C.; RAHMANA, A. N. M. A.; HAIDERB, M. G.; ISLAM, M.A. Molecular characterization of *Staphylococcus aureus* strains in bovine mastitis milk in Bangladesh. **International Journal of Veterinary Science and Medicine**, v. 6, p. 53-60, 2018.
- INSTITUTO ADOLFO LUTZ. Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz. Métodos físico-químicos para análise de alimentos. São Paulo: Instituto Adolfo Lutz. 4ª edição, 1020 p., 2008.
- INSTITUTO ANTONIO ERNESTO DE SALVO. Regulamento de Uso - Indicação Procedência “Canastra”. 2011. Disponível em: <https://www.sertaobras.org.br/wp-content/uploads/2011/03/CANASTRA-INAES-doc.-5-regulamento-de-uso-alterado-ok.pdf>. Acesso em 18 ago. 2018.
- INSTITUTO MINEIRO DE AGROPECUÁRIA. Lista produtores cadastrados no programa do Queijo Minas Artesanal - atualizada em 29/05/2017. Disponível em: <http://www.ima.mg.gov.br/component/search/?searchword=Queijo+Artesanal&ordering=&searchphrase=all>. Acesso em: 11 de jul. 2017.
- INSTITUTO MINEIRO DE AGROPECUÁRIA. Queijo Minas Artesanal. Disponível em: <http://www.ima.mg.gov.br/queijo-minas-artesanal>. Acesso em: 10 set. 2018.
- ISIDORO, W. R. Caracterização da microbiota de queijos artesanais provenientes da Serra da Canastra – MG e da cultura iniciadora natural utilizada em sua produção. 2019. 79 p. Dissertação (Mestre em Ciências dos Alimentos) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo.
- IOANNA, F.; QUAGLIA, N. C.; STORELLI, M. M.; CASTIGLIA, D.; GOFFREDO, E.; STORELLI, A.; DE ROSA, M.; NORMANNO, G.; CAPUTI JAMBRENGHI, A.; DAMBROSIO, A. Survival of *Escherichia coli* O157:H7 during the manufacture and ripening of *Cacioricotta* goat cheese. **Food Microbiology**, v. 70, p. 200-205, 2018.
- 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. Acesso em: 16 jun 2017.

ISO 6579:2002. Microbiology of food and animal feeding stuffs — Horizontal method for the detection of *Salmonella* spp., 4th ed 2002. The International Organization for Standardization, Amendment 1:15/07/2007.

ISO 6888-1. Microbiology of food and animal feeding stuffs — Horizontal method for the enumeration of coagulase-positive staphylococci (*Staphylococcus* coagulase positive and other species) – Part I: Technique using Baird Parker agar medium. 1st ed., 1999. Amendment 1:2003. Geneva: The International Organization for Standardization.

ISO 11290-1. Microbiology of food and animal feeding stuffs - Horizontal methods for the detection and enumeration of *Listeria monocytogenes* – Part 1: detection method, 1st ed. 1996, Amendment 1, 2004. Geneva: The International Organization for Standardization.

JAKOBSEN, R. A.; HEGGEBØ, R.; SUNDE, E. B.; SKJERVHEIM, M. *Staphylococcus aureus* and *Listeria monocytogenes* in Norwegian raw milk cheese production. **Food Microbiology**, v. 28, p. 492-496, 2011.

JAMALI, H.; PAYDAR, M.; RADMEHR, B.; ISMAIL, S.; DADRASNIA, A. Prevalence and antimicrobial resistance of *Staphylococcus aureus* isolated from raw milk and dairy products. **Food Control**, v. 54, p. 383 – 388, 2015.

JAY, J. M. Microbiologia de Alimento, trad. Eduardo César Tondo et al. Porto Alegre: Artmed, ed. 6, p. 508-510, 2005.

JOHLER, S.; LAYER F.; STEPHAN, R. Comparison of virulence and antibiotic resistance genes of food poisoning outbreak isolates of *Staphylococcus aureus* with isolates obtained from bovine mastitis milk and pig carcasses **Journal of Food Protection**, v. 74, p. 1852-1859, 2011.

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.

JØRGENSEN, H. J.; MØRK, T.; CAUGANT, D. A.; KEARNS, A.; RØRVIK, L. M. Genetic variation among *Staphylococcus aureus* strains from Norwegian bulk milk. **Applied and Environmental Microbiology**, v.71, i.12, p. 52-61, 2005.

KORNACKI, J.L.; GURTLER, J.B.; STAWICK, B.A. Enterobacteriaceae, coliforms, and *Escherichia coli* as quality and safety indicators. 2015. In: SALFINGER, Y.; TORTORELLO, M.L. (eds.), Compendium of Methods for the Microbiological

Examination of Foods, 5th ed, Chapter 9, pp.103-120. Washington, DC: American Public Health Association (APHA).

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

KÜMMEL, J.; STESSL, B.; GONANO, M.; WALCHER, G.; BEREUTER, O.; FRICKER, M.; GRUNERT, T.; WAGNER, M.; EHLING-SCHULZ, M. *Staphylococcus aureus* entrance into the dairy chain: Tracking *S. aureus* from dairy cow to cheese. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, i. 1603, 2016.

KURELJUŠIĆ, J.; ROKVIĆ, N.; JEZDIMIROVIĆ, N.; KURELJUŠIĆ, B.; PISINOV, B.; N KARABASIL, N. Isolation and detection of *Listeria monocytogenes* in poultry meat by standard culture methods and PCR. IOP Conference Series: Earth and Environmental Science, v. 85. 2017.

LARPIN, S.; MONDOLONI, C.; GOERGES, S.; VERNOUX, J.-P.; GUÉGUEN, M.; DESMASURES, N. *Geotrichum candidum* dominates in yeast population dynamics in Livarot, a French red-smear cheese. **FEMS Yeast Research**, v. 6, p. 1243–1253, 2006.

LE MINISTÈRE DE L'AGRICULTURE ET DE L'ALIMENTATION. Consommation de fromages à base de lait cru: rappel des précautions à prendre. Disponível em: <https://agriculture.gouv.fr/consommation-de-fromages-base-de-lait-cru-rappel-des-precautions-prendre>. Acesso em: 19 jul. 2019.

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

LIMA, R. S.; DOULA, S. M. A tradição e a lei - o queijo Minas artesanal e os impasses da legislação sanitária no impedimento de sua comercialização fora do estado de MG. **Revista Faz Ciência**, v.14, n.19, p.181-195, 2012.

LIU, D. Identification, subtyping and virulence determination of *Listeria monocytogenes*, an important foodborne pathogen. **Journal of Medical Microbiology**, v. 55, p. 645-659, 2006.

MARIANI, C.; BRIANDET, R.; CHAMBA, J-F.; NOTZ, E.; CARNET-PANTIEZ, A.; EYOUNG, R. N.; OULAHAL, N. Biofilm ecology of wooden shelves used in

ripening the French raw milk smear cheese Reblochon de Savoie. **Journal of Dairy Science**, v. 90, p.1653-1661, 2007.

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.

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.

McLAUHLIN, J.; MITCHELL, R.T.; SMERDON, W.J.; JEWELL K. *Listeria monocytogenes* and listeriosis: A review of hazard characterization for use in microbiological risk assessment of foods. **International Journal of Food Microbiology**, v.92, p. 15-33, 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.

MENEZES, M. F. C.; SIMEONI, C. P.; ETCHEPARE, M. A.; HUERTA, K.; BORTOLUZZI, D. P.; MENEZES, C. R. Microbiota e conservação do leite. **Revista Eletronica em Gestão, Educação e Tecnologia Ambiental – REGET**, v. 18. p. 76-89, 2014.

MINAS GERAIS. Lei nº 14.185 de 31 de janeiro de 2002. Dispõe sobre o processo de produção do Queijo Minas Artesanal e dá outras providências. Belo Horizonte: Palácio da Liberdade, 31 jan. 2002.

MINAS GERAIS. Decreto nº 42.645 de 05 de junho de 2002. Aprova o Regulamento da Lei nº 14.185, de 31 janeiro de 2002, que dispõe sobre o processo de produção de Queijo Minas Artesanal. Belo Horizonte: Palácio da Liberdade, 05 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: 16 jun. 2017.

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

MINAS GERAIS. Portaria IMA nº1810, de 24 de abril de 2018. Alteração do artigo 1º da Portaria nº 694, de 17 de novembro de 2004, para incluir o município de Córrego D'anta na microrregião da Canastra. Minas Gerais, Belo Horizonte, 24 abr. 2018.

- 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.
- MINITAB, Inc. Minitab 18 Statistical Software, Minitab, Inc.: State College, PA, USA, 2010.
- 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.
- MORGAN, F.; BONNIN, V.; MALLEREAU, M. P.; PERRIN, G. Survival of *Listeria monocytogenes* during manufacture, ripening and storage of soft lactic cheese made from raw goat milk. **International Journal of Food Microbiology**, v. 64, p.217–221, 2001.
- NARDES, R. E. F. *et al.* Características reológicas do queijo Zamorano com modificações na temperatura de maturação. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, v. 61, p. 29-37, 2006.
- 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.
- NATIONAL ACADEMIES PRESS. Scientific Criteria to Ensure Safe Food. 2013. Disponível em: <http://www.nap.edu/catalog/10690.html>. Acesso em: 19 jul. 2019.
- NAYAK, R.; STEWART, T.; WANG, R. F.; LIN, J.; CERNIGLIA, C. E.; KENNEY, P. B. Genetic diversity and virulence gene determinants of antibiotic-resistant *Salmonella* isolated from preharvest turkey production sources. **International Journal of Food Microbiology**, v. 91, i. 1, p. 51-62, 2004.
- NÓBREGA, J. E. Caracterização do fermento endógeno utilizado na fabricação do queijo Canastra no município de Medeiros, Minas Gerais, com ênfase em leveduras. 2007. 94p. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimento) – Universidade Federal de Viçosa.
- OKURA, M. H. Avaliação microbiológica de queijos tipo minas frescal 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, L. G. Caracterização microbiológica e físico-química durante a maturação em diferentes épocas do ano de queijo minas artesanal de produtores cadastrados da mesorregião de Campo das Vertentes – mg. 2014. 111p. Dissertação (Mestre em Ciência Animal) – Universidade Federal de Minas Gerais.
- OLSEN, S. J.; MACKINON, L. C.; GOULDING, J. S.; BEAN, N. H.; SLUTSKER, L. Surveillance for foodborne disease outbreaks—United States, 1993–1997. *Morbidity and Mortality Weekly Report*, v. 49, p. 1–51, 2000.
- OMBARAKA, R. A.; HINENOYAA, A.; AWASTHIA, S. P.; IGUCHI, A.; SHIMAA, A.; ELBAGORYB, A-R. M.; YAMASAKI, S. Prevalence and pathogenic potential of *Escherichia coli* isolates from raw milk and raw milk cheese in Egypt. **International Journal of Food Microbiology**, v. 221, p. 69–76, 2016.
- PAIVA, P. H. C. Tratamento da casca do queijo Canastra com resina e seus efeitos durante a maturação e na qualidade como forma de melhorar o aspecto e agregar valor ao produto. 2012. 91 p. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia do Leite e Derivados) –Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora.
- PARÁ. Agência Estadual de Defesa Agropecuária do Estado do Pará. Portaria ADEPARA 418, de 26 de fevereiro de 2013. Aprova o Regulamento Técnico de Produção do Queijo do Marajó e dá outras providências. **Diário Oficial Eletrônico do Pará**, Belém, 4 mar. 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.
- 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.
- PINTO, M. S.; DE CARVALHO, A. F.; PIRES, A. C. S.; DE PAULA, J. C. J.; SOBRAL, D.; MAGALHÃES, F. A. R. Survival of *Listeria innocua* in Minas Traditional Serro cheese during ripening. **Food Control**. v. 20, p. 1167-1170, 2009.

PLATAFORMA PORTUGUESA DE INFORMAÇÃO ALIMENTAR. Guia para o Estabelecimento de Critérios Microbiológicos em Géneros Alimentícios. Disponível em: http://repositorio.insa.pt/bitstream/10400.18/4701/3/Guia%20Crit%C3%A9rios%20Microbiol%C3%B3gicos_VFinal_20170413.pdf. Acesso em: 24 jul. 2019.

RADOSTITS, O.M., LESLIE, K.E., FETROW, J. Herd Health – Food Animal Production Medicine. Philadelphia: Saunders, 1994. 631p.

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 (Mestre em Ciência Animal) - Universidade Federal de Minas Gerais – UFMG.

RESENDE, M. F. S.; COSTA, H. H. S.; ANDRADE, E. H. P.; ACÚRCIO, L. B.; DRUMMOND, A. F.; CUNHA, A. F.; NUNES, A. C.; MOREIRA, J. L. S.; PENNA, C. F. A. M; SOUZA, M. R. Queijo de minas artesanal da Serra da Canastra: influência da altitude das queijarias nas populações de bactérias ácido lácticas. Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia, v.63, n.6, p.1567-1573, 2011.

RIO GRANDE DO SUL. Instrução Normativa SEAGRI Nº 7 DE 09 de dezembro de 2014. Aprova o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade do Queijo Serrano. Diário Oficial Eletrônico do Rio Grande do Sul, 10 dez. 2014.

RIO GRANDE DO SUL. LEI Nº 14.973, DE 29 DE DEZEMBRO DE 2016. Dispõe sobre a produção e a comercialização do queijo artesanal serrano no Estado do Rio Grande do Sul. Diário Oficial Eletrônico do Rio Grande do Sul, 10 dez. 2014.

RIO GRANDE DO NORTE. Lei nº 10.230, de 07 de agosto de 2017. Dispõe sobre a produção e a comercialização de queijos e manteiga artesanais do Rio Grande do Norte – Lei NIVARDO MELLO. Diário Oficial Eletrônico do Rio Grande do Norte, Natal, 8 ago. 2017.

RIO GRANDE DO NORTE. Decreto nº 28012 DE 30 de maio de 2018. Altera o Decreto Estadual nº 27.683, de 26 de janeiro de 2018, que regulamentou a Lei Estadual nº 10.230, de 7 de agosto de 2017, que trata da produção e da comercialização de queijos e manteiga artesanais do Rio Grande do Norte - Lei Nivardo Mello. Diário Oficial Eletrônico do Rio Grande do Norte, Natal, 31 mai. 2018.

RIO GRANDE DO SUL. Decreto nº 54.199, de 24 de agosto de 2018. Regulamenta a Lei nº 14.973, de 29 de dezembro de 2016, que dispõe sobre a produção e a

comercialização do queijo artesanal serrano no Estado do Rio Grande do Sul. Diário Oficial Eletrônico do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 25 ago. 2018.

SANTA CATARINA. Decreto nº 1238, de 19 de julho de 2017. Regulamenta a Lei nº 17.003, de 2016, que dispõe sobre a produção e a comercialização do queijo artesanal serrano, no Estado de Santa Catarina. Diário Oficial Eletrônico de Santa Catarina, 20 jul. 2017.

SANTA CATARINA. Lei nº 17.486, de 16 de janeiro de 2018. Dispõe sobre a produção e comercialização de queijos artesanais de leite cru e adota outras providências. Diário Oficial Eletrônico de Santa Catarina, 27 jan. 2018.

SANT'ANNA, F. M.; WETZELSB, S. U.; CICCIO, S. H. S.; FIGUEIREDO, R. C.; SALES, G. A.; FIGUEIREDO, N. C.; NUNES, C. A. SCHMITZ-ESSER, S.; MANN, E.; WAGNER, M.; SOUZA, M. R. Microbial shifts in Minas artisanal cheeses from the Serra do Salitre region of Minas Gerais, Brazil throughout ripening time. **Food Microbiology**, v.82, p. 349–362, 2019.

SILVA, J. G. Características físicas, físico-químicas e sensoriais do queijo Minas artesanal da Canastra. 2007. 198p. Dissertação (Mestre em Ciência dos Alimentos) – Universidade Federal de Lavras.

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, 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.

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.

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.

- SOBRINHO, P. S.C; FARIA, C. A. M.; PINHEIRO, J. S.; ALMEIDA, H. G.; PIRES, C. V.; SANTOS, A. S. Bacteriological Quality of Raw Milk Used for Production of a Brazilian Farmstead Raw Milk Cheese. **Foodborne Pathogens and Disease**, v. 9, n. 2, 2012.
- SOUZA, C. F. V.; ROSA, T. D.; AYUD, M. A. Z. Changes in the microbiological and physicochemical characteristics of Serrano cheese during manufacture and ripening. **Brazilian Journal of Microbiological**, v. 34, p. 260-266, 2003.
- TABLA, R.; GÓMEZ, 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**, v.145, p. 123–129, 2016.
- TAKAHASHI, H.; SAITO, R.; MIYA, S.; TANAKA, Y.; MIYAMURA, N.; KUDA, T.; KIMURA, B. Development of quantitative real-time PCR for detection and enumeration of Enterobacteriaceae. **International journal of food microbiology**, v.246, p.92-97, 2017.
- TARGETMAP. Mapa do queijo minas artesanal (adaptado). Disponível em: <https://www.targetmap.com/viewer.aspx?reportId=61768>. Acesso em: 20 ago. 2018.
- TAYLOR, E. HACCP in small companies: Benefit or burden? **Food Control**, v.12, p. 217–222, 2001.
- TORRES, C. P. Caracterização da atividade leiteira de escala comercial no município de campo largo – PR. 2014. 93p. Trabalho de Conclusão do Curso de Graduação em Zootecnia da Universidade Federal do Paraná – Curitiba.
- TORNADIJO, M. E.; GARCÍA, M.C.; FRESNO, J. M.; CARBALLO, J. Study of Enterobacteriaceae during the manufacture and ripening of San Simòn cheese. **Food Microbiology**, v. 18, p. 499-509, 2001.
- 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.
- WALKER, E.; PRITCHARD, C.; FORSYTHE, S. Food handler's hygiene knowledge in small food businesses. **Food Control**, v. 14, p.339–343, 2003.
- 3M. Petrifilm *E. coli* Count System Interpretation Guide. EUA, 2014. Disponível em: <https://multimedia.3m.com/mws/media/2362460/petrifilm-ecoli-coliform-interpretation-guide.pdf>. Acesso em: 16 ago. 2017.

- 3M. Petrifilm Staph Express Count System Interpretation Guide. EUA, 2016. Disponível em: <https://multimedia.3m.com/mws/media/2412800/petrifilm-staph-express-interpretation-guide.pdf>. Acesso em: 16 ago. 2017.