



FERNANDA DE JESUS RAMOS

**QUALIDADE MICROBIOLÓGICA DE 2 TEMPOS DE
MATURAÇÃO DE QUEIJO MINAS ARTESANAL
PRODUZIDO NA REGIÃO DO CAMPO DAS VERTENTES**

**LAVRAS-MG
2023**

FERNANDA DE JESUS RAMOS

**QUALIDADE MICROBIOLÓGICA DE 2 TEMPOS DE MATURAÇÃO DE QUEIJO
MINAS ARTESANAL PRODUZIDO NA REGIÃO DO CAMPO DAS VERTENTES**

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado à Universidade Federal
de Lavras, como parte das exigências
do Curso de Engenharia de
Alimentos, para a obtenção do título
de Bacharel.

Profa. Dra. Roberta Hilsdorf Piccoli
Orientadora

MSc. Anderson Henrique Venâncio
Coorientador

**LAVRAS-MG
2023**

FERNANDA DE JESUS RAMOS

**QUALIDADE MICROBIOLÓGICA DE 2 TEMPOS DE MATURAÇÃO DE QUEIJO
MINAS ARTESANAL PRODUZIDO NA REGIÃO DO CAMPO DAS VERTENTES**

**MICROBIOLOGICAL QUALITY OF 2 TIMES OF MATURATION OF ARTISAN
MINAS CHEESE PRODUCED IN THE CAMPO DAS VERTENTES REGION**

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado à Universidade Federal de
Lavras, como parte das exigências do
curso de Engenharia de Alimentos para
a obtenção do título de Bacharel.

APROVADA em 25 de julho de 2023.

MSc. Anderson Henrique Venâncio - UFLA

MSc. Bruna Azevedo Balduino - UFLA



Profa. Dra. Roberta Hilsdorf Piccoli
Orientadora

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus e nossa Senhora Aparecida por serem meu porto seguro.

Aos meus pais Marcos e Elizabet que sempre serão meus maiores exemplos de vida, pelo seu amor incondicional, minha enorme gratidão por tudo que fazem e fizeram para que eu pudesse chegar até aqui, ao meu irmão Marcos Alexandre pela força e companherismo.

Aos meus avós João Pedro e Umbelina que mesmo não estando mais presente fisicamente mas sempre apoiaram e confiaram nos meus sonhos e que de algum lugar se encontram felizes com essa conquista.

A todos os meus tios em especial a Luara que acreditou e patrocinou o meu sonho como se fosse dela por me fazer presente durante todas as suas orações.

Ao meu noivo Biasy pelo amor, compreensão e companhia nos momentos bons e difíceis.

Agradeço a todos os meus amigos que, perto ou longe, se fizeram presentes em cada momento da graduação. Destaco aqui Paula Vieira, Isabella Teixeira, Luísa Araujo e Maria Isabel Santana por compartilharem momentos de tristeza e alegria desde o início da jornada acadêmica.

A minha orientadora Dra. Roberta Hilsdorf Piccoli, por ser minha maior inspiração, por me acolher tão bem no laboratório desde a iniciação científica por todo carinho, dedicação e paciência.

Ao meu coorientador Anderson e pela orientação, paciência e disponibilidade.

A Bruna pela disponibilidade e pelos conhecimentos repassados e pela participação na banca de defesa.

A Mônica pela motivação e conhecimentos repassados.

A Universidade Federal de Lavras pela sua excelência de ensino disponibilizada a mim durante todos esses anos, fazendo-me crescer tanto academicamente quanto profissionalmente.

RESUMO

O queijo Minas artesanal é um produto que carrega consigo tradição histórica e cultural de grande importância no estado de Minas Gerais, Brasil. É conhecido por seu sabor único, sendo produzido a partir do leite cru e, quando preparado sem os devidos cuidados de boas práticas de fabricação (BPF), pode veicular bactérias potencialmente patogênicas. Esse trabalho teve como objetivo realizar avaliações microbiológicas de dois tempos de maturação (22 e 45 dias) de queijo Minas artesanal da microrregião do Campo das Vertentes, no município de Carrancas-MG. Foram realizadas as análises de fungos e leveduras, bactérias lácticas, coliformes totais e termotolerantes, *Escherichia coli*, Estafilococos coagulase positiva; e presença/ausência de *Listeria monocytogenes* e *Salmonella*. Os resultados para o queijo com 22 dias de maturação, mostrou valores de coliformes termotolerantes (> 1.100 NMP/g); *E.coli* ($1,1 \times 10^5$ NMP/g) e Estafilococos coagulase positiva ($4,6 \times 10^4$ UFC/g) acima do permitido pela legislação. *Listeria monocytogenes* e *Salmonella* spp não foram encontrados nas amostras de queijo analisadas nos diferentes tempos de maturação. Esses resultados demonstram que vários aspectos durante a produção ainda precisam ser melhorados, as propriedades rurais precisam se adaptar às exigências das instalações de produção de queijo, implementar boas práticas agrícolas e capacitar os colaboradores em boas práticas de fabricação. Dessa forma, conclui-se que, para as amostras analisadas apenas o queijo com 45 dias de maturação encontra-se de acordo com os padrões microbiológicos oficiais, sendo considerado seguro para o consumo.

Palavras-chave: Patógenos alimentares. Lácteos. Segurança de alimentos. Bactérias patogênicas. Queijos artesanais.

ABSTRACT

Minas artisanal cheese is a product that carries with it a historical and cultural tradition of great importance in the state of Minas Gerais, Brazil. It is known for its unique flavor, being produced from raw milk and, when prepared without proper care of good manufacturing practices (GMP), can carry potentially pathogenic bacteria. This work aimed to carry out microbiological evaluations of two maturation times (22 and 45 days) of Minas artisanal cheese from the Campo das Vertentes microregion, in the municipality of Carrancas-MG. Analyzes of fungi and yeasts, lactic acid bacteria, total and thermotolerant coliforms, *Escherichia coli*, coagulase positive *Staphylococci*; and presence/absence of *Listeria monocytogenes* and *Salmonella*. The results for cheese aged 22 days showed values of thermotolerant coliforms ($> 1,100$ MPN/g); *E.coli* (1.1×10^5 NMP/g) and coagulase positive *Staphylococci* (4.6×10^4 UFC/g) above the legal limit. *Listeria monocytogenes* and *Salmonella* spp were not found in the cheese samples analyzed at different maturation times. These results demonstrate that several aspects during production still need to be improved, rural properties need to adapt to the requirements of cheese production facilities, implement good agricultural practices and train employees in good manufacturing practices. Thus, it is concluded that, for the analyzed samples, only the cheese with 45 days of maturation meets the official microbiological standards, being considered safe for consumption.

Keywords: Food pathogens. Dairy. Food safety. Pathogenic bacteria. Artisan cheeses.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	8
2. OBJETIVOS.....	10
2.1 Objetivo geral.....	10
2.2 Objetivos específicos.....	10
3. REFERENCIAL TEÓRICO.....	11
3.1 Queijos minas artesanal.....	11
3.2 Microrganismos indicadores de qualidade microbiológica dos QMA.....	12
3.2.1 Coliformes totais e termotolerantes.....	12
3.2.2 <i>Escherichia coli</i>	13
3.2.3 Estafilococos coagulase positiva.....	13
3.2.4 Fungos e Leveduras.....	14
3.3 Bactérias láticas.....	14
3.4 <i>Salmonella</i> sp.....	15
3.5 <i>Listeria monocytogenes</i>	16
3.6 Região de Carrancas-MG.....	16
3.7 Legislação do Queijo Minas Artesanal.....	17
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	19
4.1 Coleta de amostras e local de condução das análises.....	19
4.2 Análises microbiológicas.....	19
4.2.1 Preparo das amostras.....	19
4.2.2 Contagem de bactérias láticas.....	19
4.2.3 Enumeração de fungos e leveduras.....	20
4.2.4 Identificação de <i>Salmonella</i> spp.....	20
4.2.5 Quantificação de Coliformes.....	20
4.2.6 Quantificação de estafilococos coagulase positiva.....	21
4.2.7 Identificação de <i>Listeria monocytogenes</i>	21
4.3 Preparo das amostras para identificação no Maldi-tof MS (Matrix – assistial laser desorption/ionization – time off light-mass spectroscopy).....	22
4.3.1 Identificação dos isolados bacterianos por MALDI-TOF MS.....	22
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	23
6. CONCLUSÃO.....	28
REFERÊNCIAS.....	29

1. INTRODUÇÃO

O Queijo Minas Artesanal (QMA) é um produto que carrega consigo tradição histórica e cultural de grande importância no estado de Minas Gerais. Além disso, muitas famílias têm o QMA como sua principal fonte de renda. Apesar dessa importância, uma parcela significativa dessa produção é informal do ponto de vista sanitário, tributário e fiscal.

Produzido a partir de, basicamente, leite cru, pingo (soro recolhido da produção do dia anterior), coalho e sal, os queijos artesanais são maturados em prateleira de madeira, sendo que cada propriedade, com seus processos, climas e formas de prensagem, garante aspecto e sabor específicos do produto.

Geralmente, ele é feito em pequenas propriedades rurais utilizando receitas de conhecimento familiar transmitidas entre gerações. Ele é conhecido por seu sabor e qualidade únicos, sendo produzido a partir do leite cru e, quando preparado sem os devidos cuidados de boas práticas de fabricação, pode veicular bactérias potencialmente patogênicas.

Por se tratar de produto elaborado a partir de leite cru, é crucial tomar cuidados especiais em todas as etapas da cadeia de produção, desde a saúde do rebanho até a embalagem e exposição do produto final para venda. É fundamental seguir procedimentos higiênicos-sanitários adequados para garantir que não ocorra contaminação que possa representar riscos para a saúde dos consumidores (MINAS GERAIS, 2018).

Os queijos apresentam microbiota variada, sendo composta por microrganismos desejáveis e indesejáveis. Dentre as bactérias desejáveis estão as bactérias ácido-láticas (BAL) que contribuem para acrescentar características sensoriais ao produto e auxiliam na sua segurança microbiológica. Já os microrganismos indesejáveis, podem indicar ausência de boas práticas de fabricação ou o tempo inadequado de maturação de acordo com o estabelecido por lei, são *Salmonella* e *Listeria monocytogenes* (ausência/preseça) *Escherichia coli/g* e Estafilococos coagulase positiva/g que devem ser eliminados durante a maturação (JAY, MARTIN; GOLDEN, 2005; BAIRROS, 2016).

Vários fatores podem influenciar no sabor do queijo como a altitude, clima, pastagem das vacas que, conseqüentemente, irão atribuir sabor único ao queijo de cada região. A qualidade varia de acordo com a microrregião onde é produzido, com isso se torna necessário caracterizar microbiologicamente o produto em diferentes áreas (IPHAN, 2008).

Carrancas é uma cidade mineira entre o sul de Minas, o Oeste e a Zona da Mata localizada no Campo das Vertentes. Estabelecida em uma das maiores extensões de serra de quartzito de Minas Gerais, possui clima tropical de altitude caracterizado por verões amenos e úmidos e invernos secos, tendo como principais atividades econômicas a Agropecuária Leiteira e o Ecoturismo.

A avaliação microbiológica do queijo permite determinar sua qualidade e identificar

possíveis contaminações, garantindo a segurança alimentar do produto. Dependendo da região em que os queijos artesanais são produzidos, observam-se importantes diferenças de características físico-químicas, sensoriais e microbiológicas que podem influenciar na qualidade e sabor do queijo.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Comparar a qualidade microbiológica de dois tempos de maturação de queijo Minas artesanal produzido no município de Carrancas- MG.

2.2 Objetivos específicos

- a) Quantificar fungos e leveduras, estafilococos coagulase positiva, coliformes e *Escherichia coli*.
- b) Avaliar a presença e ausência de *Salmonella* e *Listeria monocytogenes* conforme a legislação (Portaria IMA nº 2033 de 23 de janeiro de 2021).
- c) Quantificar e comparar o número de bactérias lácticas entre os dois tempos de maturação.
- d) Comparar a qualidade microbiológica dos queijos com 22 dias e 45 dias de maturação e verificar se ambos atendem aos parâmetros microbiológicos para QMA exigidos pela legislação vigente.
- e) Verificar se o período de maturação tem interferência na qualidade microbiológica do queijo

3. REFERENCIAL TEÓRICO

3.1 Queijo minas artesanal

O Queijo Minas Artesanal (QMA) foi reconhecido como Patrimônio Cultural Imaterial Brasileiro no ano de 2008. Sua produção representa uma tradição no estado de Minas Gerais, desde os tempos antigos, com variações que perduram até os dias de hoje. Atualmente, cada região geográfica específica do estado de Minas Gerais possui características reconhecidas e distintas, resultado das condições físicas, naturais, econômicas e socioculturais particulares de cada localidade (IPHAN, 2008).

Atualmente, o QMA é produzido em 10 microrregiões do estado de Minas Gerais, sendo elas: Araxá, Campo das Vertentes, Canastra, Cerrado, Diamantina, Entre Serras da Piedade ao Caraça, Serras da Ibitipoca, Serra do Salitre, Serro e Triângulo Mineiro (FAEMG, 2022).

De maneira geral, estes queijos têm forma cilíndrica com diâmetro de 15 a 16 centímetros e altura de 4 a 8 centímetros, lados retos e superfícies planas, pesando, geralmente, cerca de 1 a 1,2 kg. A casca torna-se mais amarela conforme o tempo de maturação, já a consistência mais mole, com o tempo, tende a ser mais firme. A textura do QMA é lisa e pode apresentar pequenos poros mecânicos. Seu interior tem coloração branca e é cremoso e uniforme. O padrão estético do queijo é uma característica importante na comercialização do produto e em sua apresentação individual pelos produtores artesanais (MENESES, 2006).

Apesar de ser o mesmo produto em todas essas regiões, cada local confere ao queijo uma identidade única, refletindo aspectos socioculturais que moldaram métodos próprios de manipulação do leite, coalho, massa, formas de prensagem, processo de cura e tradições comerciais. A essas técnicas específicas de produção somam-se formas de vida, significados atribuídos, sentidos e simbologias que são associados aos queijos artesanais (IPHAN, 2008).

Além disso, devido ao fato de as diferentes regiões apresentarem fatores físico-naturais que proporcionam pastagens naturais distintas e o desenvolvimento de bactérias específicas, que se multiplicam em microclimas característicos, cada queijo produzido em um local, tem aparência e sabor únicos (IPHAN, 2008).

Diferentemente da produção industrial, o QMA não utiliza a pasteurização do leite, nem processos mecanizados. Além disso, é obrigatório o uso do "pingo", o soro fermentado salgado coletado da fabricação de queijos anteriores, que é utilizado na fabricação diária. É importante ressaltar que na produção do QMA é proibido qualquer tipo de aditivo ou coadjuvante, como reguladores de acidez, aromatizantes, conservantes, corantes, agentes de maturação e estabilizantes (IMA, 2011).

Sua produção deve ser realizada com leite cru, o qual após a ordenha manual deve ser

filtrado com auxílio de tecido sintético previamente lavado e desinfetado e transferido para o tanque onde ocorrerá a produção. A partir desse momento, dá-se início à produção dos queijos, adicionando-se coalho e o pingo – fermento natural que contém uma variedade de bactérias lácticas específicas de cada região (MENESES, 2006).

Após aproximadamente 40 minutos da adição do coalho e do pingo, o leite coagula, e a massa resultante está pronta para ser "cortada". Após a separação do soro, a massa do queijo é colocada em formas circulares de plástico e prensada manualmente. Durante o processo de enformagem, é aplicado sal grosso em uma das superfícies do queijo (CHAVES; MONTEIRO; MACHADO, 2018). Após 6 a 12 horas da enformagem, a forma do queijo é virada, repetindo-se o processo de salga. Depois de 24 a 48 horas, o queijo é retirado da forma e colocado em prateleiras de madeira, conforme permitido pela legislação, para iniciar o processo de maturação. O tempo de maturação varia de 14 a 22 dias, dependendo da microrregião específica (CHAVES; MONTEIRO; MACHADO, 2018).

Destaca-se que a produção de queijo artesanal segue normas sanitárias rigorosas para garantir a segurança alimentar. Os produtores devem seguir práticas de higiene estritas e garantir a qualidade do leite utilizado, além de maturar o queijo que ajudam a eliminar potenciais patógenos presentes no leite cru. Porém, este processo de fabricação pode apresentar riscos para os seres humanos se não forem tomados os devidos cuidados como a qualidade microbiológica do leite utilizado, uma vez que as bactérias naturais presentes no leite não são eliminadas uma vez que esse não é submetido ao tratamento térmico (LOURENCO et al., 2020).

Sendo assim, existe risco associado ao consumo deste tipo de queijo, os quais podem conter bactérias causadoras de infecções alimentares como *Listeria monocytogenes*, *Salmonella*, patótipos de *Escherichia coli*, incluindo brucelose e tuberculose (BRUMANO, 2016).

3.2 Microrganismos indicadores de qualidade microbiológica dos QMA

3.2.1 Coliformes totais e termotolerantes

São bactérias Gram-negativas, anaeróbias facultativas, em forma de bastonetes. Os coliformes são divididos em dois grupos: coliformes totais e coliformes termotolerantes. O grupo dos coliformes totais engloba as enterobactérias que fermentam a lactose com produção de gás após 24 a 48 horas de incubação a 35°C. Já o grupo dos coliformes termotolerantes, chamados também de coliformes fecais, é um subgrupo dos coliformes totais capazes de fermentar a lactose com produção de gás após 24 horas de incubação a 44,5 – 45,5°C (SILVA; JUNQUEIRA; SILVEIRA, 2010).

Os coliformes são microrganismos que podem causar defeitos em queijos, levando à

deterioração, como o estufamento precoce, que compromete a aparência e o sabor do produto. Esses microrganismos são frequentemente utilizados como indicadores de qualidade sanitária dos alimentos. Sua presença em queijos é um indicativo de manipulação inadequada. A falta de sanitização dos equipamentos e o manuseio inadequado são as causas mais comuns da presença desses microrganismos (ARAÚJO, 2004).

3.2.2 *Escherichia coli*

Escherichia coli é uma bactéria pertencente à família *Enterobacteriaceae* e é comumente encontrada no intestino de humanos e animais saudáveis, desempenhando papel importante no processo digestivo e é considerada parte da microbiota normal do trato intestinal. No entanto, algumas cepas de *E. coli* podem ser patogênicas e causar doenças, principalmente quando há a ingestão de alimentos ou água contaminados com essas cepas (MORATO et al., 2009).

Dentre essas estão *E. coli* enterotoxigênica (causa diarreia), *E. coli* enteropatogênica (causa diarreia em crianças), *E. coli* enterohemorrágica (associada a colite hemorrágica e síndrome hemolítica-urêmica), *E. coli* enteroinvasiva (provoca doença semelhante à disenteria) e *E. coli* enteroagregativa (associada a surtos de diarreia) (CÔRREA, 2012).

3.2.3 *Estafilococos coagulase positiva*

Estafilococos coagulase positiva possuem uma capacidade significativa de multiplicação nos tecidos dos animais e seres humanos e de produção de toxinas nos alimentos, o que pode levar ao desenvolvimento de intoxicações alimentares. Dentre as principais espécies deste grupo estão *Staphylococcus aureus*, conhecido por causar uma variedade de infecções graves e produção de toxinas nos alimentos; *Staphylococcus epidermidis*, comumente encontrado na pele e associado a infecções relacionadas a dispositivos médicos; *Staphylococcus saprophyticus*, causa comum de infecções do trato urinário em mulheres sexualmente ativas; e *Staphylococcus haemolyticus*, frequentemente relacionado a infecções de feridas e bacteremia (TORTORA; FUNKE; CASE, 2012).

As células de *S. aureus* são sensíveis ao calor e podem ser eliminadas em processos que envolvem altas temperaturas. No entanto, suas toxinas são termoestáveis, o que significa que são resistentes às temperaturas normalmente usadas no processamento de produtos lácteos (FREITAS; MAGALHÃES, 1990).

Nos queijos, *Staphylococcus aureus*, pode ser considerado contaminante indesejado. Essas bactérias podem causar deterioração, bem como representar um risco para a saúde humana, pois podem produzir toxinas que, quando presentes em quantidades suficientes, podem causar intoxicação alimentar (SILVA et al., 2015).

A intoxicação alimentar estafilocócica ocorre devido à ingestão das toxinas produzidas durante seu crescimento em diversos alimentos, com destaque para o queijo (JAY, MARTIN; GOLDEN, 2005). Por isso é importante adotar boas práticas de higiene pessoal e manipulação segura de alimentos para evitar infecções por essas bactérias.

3.2.4 Fungos e Leveduras

A presença de bolores e leveduras em amostras de queijo Minas artesanal pode indicar falhas na higiene durante o processo de preparação caseira. Esses microrganismos são comuns no ambiente e podem contaminar os alimentos se as práticas de higiene adequadas não forem seguidas durante o processamento. A ocorrência de bolores e leveduras em queijos pode afetar negativamente a qualidade e segurança do produto. Além disso, esses microrganismos podem produzir metabólitos indesejáveis, como toxinas e compostos que alteram o sabor e a textura do queijo (BAIRROS, 2016).

Os fungos filamentosos toxigênicos, que são capazes de produzir micotoxinas, estão presentes em diversas regiões onde os alimentos são produzidos. As micotoxinas são compostos metabólicos secundários, o que significa que não desempenham um papel direto no crescimento e metabolismo dos fungos filamentosos. No entanto, essas substâncias podem ser potencialmente tóxicas tanto para seres humanos quanto para animais, devido ao seu potencial carcinogênico, teratogênico e mutagênico (TORKAR; VENGUŠT, 2008).

As micotoxinas podem ser encontradas em produtos lácteos por duas razões: contaminação indireta e contaminação direta. A contaminação indireta ocorre quando as vacas leiteiras consomem rações contaminadas com micotoxinas. Já a contaminação direta, ocorre devido ao crescimento intencional ou acidental de fungos filamentosos nos produtos lácteos. Portanto, a presença de uma micotoxina em produtos lácteos não necessariamente indica a presença de um fungo filamentoso contaminante, mas pode indicar que a toxina foi ingerida juntamente com a alimentação animal. A presença de micotoxinas em produtos lácteos pode variar e depende tanto do processo de contaminação quanto da espécie de fungo envolvida (SENGUN, YAMAN; GONUL, 2008; ABREU, 2011).

3.3 Bactérias lácticas

As bactérias lácticas (BAL) são um grupo de microrganismos Gram positivos, catalase e oxidase negativa, não esporogênicas, geralmente na forma de cocos ou bastonetes que tem como principal característica a fermentação de carboidratos, como a produção de ácido láctico (SILVA; JUNQUEIRA; SILVEIRA, 2010). De acordo com o tipo de fermentação, as BAL podem ser classificadas como homofermentativas quando produzem o ácido láctico como único produto da fermentação e heterofermentativas quando produzem dióxido de

carbono, ácido acético e etanol além do ácido lático (RESENDE, 2010).

O grupo das BAL incluem mais de 60 gêneros, contudo, os que frequentemente se destacam na fermentação de alimentos incluem *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Enterococcus*, *Weissella* dentre outras. Em 2020, Zheng et al. (2020) propuseram a fusão da família Leuconostocaceae com a família Lactobacillaceae. Além disso, o gênero *Lactobacillus* também foi reclassificado gerando 25 gêneros. Dentre estas, as principais encontradas em queijos são as *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Leuconostoc* e *Enterococcus* (BERESFORD et al., 2001; FOX et al., 2000).

Na produção do QMA é utilizado leite cru e não se empregam culturas iniciadoras comerciais, uma vez que as BAL estão naturalmente presentes no leite e no pinga e, assim, são responsáveis por desempenhar esta função. Essas bactérias se caracterizam por fermentar a lactose para produção de ácido lático, papel importante na fabricação dos queijos, enquanto outras podem ser encontradas durante a maturação (RESENDE, 2010).

As bactérias lácticas têm sido objeto de abrangentes pesquisas devido ao seu papel como conservantes biológicos, amplamente comprovados por estudos. Elas são capazes de produzir substâncias antimicrobianas e têm efeito antagônico sobre patógenos que podem estar presentes em queijos artesanais durante o processo de maturação. Este efeito benéfico contribui para melhorar a qualidade microbiológica e a segurança alimentar do produto final. A presença de bactérias lácticas nos queijos Minas artesanais desempenha um papel fundamental não só no processo de fermentação e conversão do leite em queijo. Também é importante para desenvolver as propriedades sensoriais como cheiro, textura e sabor (DE ANTÔNIO; BORELLI, 2020).

3.4 *Salmonella* sp.

Salmonella é um gênero da família *Enterobacteriaceae*, caracterizado como bastonetes Gram-negativos não esporogênicos, anaeróbios facultativos e oxidase negativos (SILVA; JUNQUEIRA; SILVEIRA, 2010). Este gênero de bactérias engloba diversas espécies, dentre elas as principais, conhecidas por causar infecções em seres humanos.

Salmonella enterica, mais comumente associada a infecções em humanos, têm várias subespécies, sorotipos e sorovares diferentes, cada um com suas próprias características e distribuição geográfica. Dentre eles estão a *Salmonella enterica* serovar Typhi que é transmitida principalmente pela ingestão de alimentos ou água contaminados; a *Salmonella enterica* serovar Enteritidis, uma das principais responsáveis por intoxicação alimentar relacionada ao consumo de ovos contaminados; a *Salmonella enterica* serovar Typhimurium transmitida por alimentos contaminados, água ou contato com animais infectados (LEEDOM LARSON; SPICKLER, 2013).

Salmonella bongori é outra espécie deste gênero de bactéria, embora seja menos

comum em infecções humanas, ela pode causar gastroenterite. É importante ressaltar que existem muitos outros sorotipos e serovares de *Salmonella* além desses, e eles podem estar associados a diferentes tipos de infecções em humanos e animais (LEEDOM LARSON; SPICKLER, 2013).

Salmonella, em geral, causa as seguintes doenças: Gastroenterites causada pela *S. Enteritidis* e *S. Typhimurium*, febre tifóide causada por *S. Typhi* e as febres entéricas causadas por *S. Paratyphi*, doença sistêmica invasiva: *S. Choleraesuis*. Entre os alimentos que podem transmitir destacam-se os produtos lácteos, ovos, produtos cárneos processados (BRASIL, 2023).

3.5 *Listeria monocytogenes*

Listeria monocytogenes é uma bactéria Gram-positiva não apresenta endósporo, móvel, anaeróbia facultativa, psicrotrófica, catalase-positivo e oxidase-negativo. Por ser intracelular facultativa, ela pode viver e se multiplicar tanto no ambiente extracelular, quanto dentro das células hospedeiras. Essa habilidade intracelular é uma das características distintivas da *Listeria* e está intimamente relacionada com a sua patogenicidade (TORTORA; FUNKE; CASE, 2012).

É heterofermentativa com produção de ácido lático, ácido acético e outros produtos finais a partir da fermentação da glicose e de outros açúcares. Encontra-se presente na natureza e tem como principal reservatório o solo, fezes humana e animais (JAY, MARTIN; GOLDEN, 2005).

Ela pode contaminar o QMA por meio do uso de leite não pasteurizado durante o processo de produção. O leite não pasteurizado pode ter sido contaminado pelo ambiente, bem como por uma infecção de mastite causada por *L. monocytogenes* durante a ordenha, transporte ou armazenamento. Além disso, a contaminação pode ocorrer durante a produção do queijo por meio de utensílios e/ou ambiente contaminados (WANG et al., 2017).

3.6 Região de Carrancas-MG

O município de Carrancas participa da microrregião produtora de QMA do Campo das Vertentes. Esta região ocupa uma área de 6.254 km quadrados, com participação dos seguintes municípios: Barroso, Conceição da Barra de Minas, Coronel Xavier Chaves, Carrancas, Lagoa Dourada, Madre de Deus de Minas, Nazareno, Prados, Piedade do Rio Grande, Resende Costa, Ritópolis, Santa Cruz de Minas, São João Del Rei, São Tiago e Tiradentes (IMA, 2009; EMATER, 2012).

Situada numa região de montanhas, onde a altitude média supera os 1000 metros, Carrancas possui clima temperado, com invernos secos e frios (VERDES EM CANTOS POUSADA, 2023). Com abundante gado leiteiro, criado em sistema extensivo e em

pastagens naturais nos vales e encostas das montanhas, ela oferece um perfeito microclima para o desenvolvimento de uma flora natural que confere ao leite e queijos da região um “*bouquet*” típico e inimitável.

Este pode ser um dos fatores que leva a região a ser referência na produção de QMA, visto que o queijo Bicas da Serra, produzido em Carrancas, foi premiado em concurso mundial de queijo (MIRAGAIA, 2019).

3.7 Legislação do Queijo Minas Artesanal

Por ser um queijo de leite cru, a legislação para o QMA é diferente daquelas para queijos de leite pasteurizado. A legislação referente ao Queijo Minas Artesanal estabelece as normas e regulamentos que governam a produção, comercialização e qualidade desse tradicional queijo brasileiro.

A partir da lei Nº 13.860 de 14 de junho de 2018 permitiu-se a comercialização de produtos alimentícios produzidos de forma artesanal, com métodos tradicionais ou regionais próprios e seguindo de boas práticas agropecuárias e de fabricação. No entanto, para que essa comercialização ocorra, é necessário que esses produtos sejam devidamente fiscalizados pelos órgãos de saúde pública dos estados e país. (MINAS GERAIS, 2018). A partir disso, várias outras legislações surgiram, com o intuito de garantir a segurança alimentar destes produtos, assim como as boas práticas de fabricação e higiene.

Dentre elas, com o intuito de estabelecer as Diretrizes para a Produção do QMA foi instituída a Portaria nº 1305, de 30 de abril de 2013, a qual decreta que o leite deve ser seguro para a produção de QMA, assim como o queijo deve ser maturado por um tempo mínimo, garantindo a sua qualidade e inocuidade (MINAS GERAIS, 2013).

A Portaria IMA Nº 2051, de 07 de abril de 2021 estabelece que o

período de maturação do queijo Minas Artesanal como mínimo de 14 (quatorze) dias para a microrregião de Araxá, Canastra e Serra do Salitre, mínimo de 17 (dezessete) dias para a microrregião do Serro e para as demais regiões do Estado, caracterizadas ou não como produtora de QMA, o período mínimo de maturação será de 22 (vinte e dois) dias ou pelo maior período especificado em estudos científicos (MINAS GERAIS, 2021).

Além desta, ainda há a Portaria IMA nº 2033, de 23 de janeiro de 2021, que “dispõe sobre os parâmetros e padrões físico-químicos e microbiológicos de alimentos de origem animal e água de abastecimento”, a qual contempla também o QMA (MINAS GERAIS,

2021). De acordo com ela, o queijo Minas Artesanal deve atender os requisitos apresentados nos Quadros 1 e 2.

Quadro 1 – Parâmetros físico-químicos que o QMA deve atender.

Parâmetro	Padrão
Umidade (g/100g)	máximo de 45,9
Amido (g/100g)	negativo
Fosfatase residual	positivo
Nitrato	Negativo *

Fonte: Brasil, 2021.

Quadro 2 – Parâmetros microbiológicos que o QMA deve atender

Parâmetro	Padrão
Coliformes a 35°C (UFC /g)	n=5; c=2; m=1.000; M=5.000
Coliformes a 45°C (UFC /g)	n=5; c=2; m=100; M=500
<i>Staphylococcus</i> coagulase positivo (UFC /g)	n=5; c=2; m=100; M=1.000
<i>Salmonella</i> spp. (/25 g)	n=5; c=0; m=0; M=-
<i>Listeria monocytogenes</i> (/25 g)	n=5; c=0; m=0; M=-

Fonte: Minas Gerais, 2021.

A partir disso, é preciso avaliar todo o processo produtivo do QMA, além do produto final, para analisar se a legislação está sendo atendida.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Coleta de amostras e local de condução das análises

As análises foram conduzidas no laboratório de Microbiologia de Alimentos, pertencente ao Departamento de Ciência dos Alimentos da Escola Superior de Ciências Agrárias (Esal) da Universidade Federal de Lavras (UFLA), Minas Gerais, Brasil. Dessa forma, foram coletadas duas unidades de queijos Minas Artesanal, em dois períodos de maturação (22 e 45 dias) em um estabelecimento comercial, cadastrado no IMA e que possui o selo arte, localizado na cidade de Carrancas, MG, Brasil.

As amostras adquiridas eram vendidas sob refrigeração e estavam devidamente embaladas a vácuo e continham as seguintes informações no rótulo: conteúdo, origem, data de fabricação e/ou validade. Dessa maneira, após a compra dos queijos, ambos foram transportados em caixas isotérmicas contendo gelo (-4° C) e encaminhados até o laboratório de Microbiologia de Alimentos (UFLA) e armazenados em geladeira até o momento da realização das análises.

4.2 Análises microbiológicas

4.2.1 Preparo das amostras

As embalagens das amostras de queijos Minas artesanal (QMA), foram higienizadas com uma solução de álcool 70% (v/v) para remoção dos possíveis contaminantes presentes. Uma espátula esterilizada foi utilizada para a coleta das unidades analíticas. O preparo dos homogenatos para análise microbiológica do QMA, foi realizado conforme descrito por Silva et al. (2017). Foram tomadas 10 g de amostra de cada queijo que foram homogeneizadas em 90 mL dos diluentes adequados em homogeneizador tipo *Stomacher* (Metroderm, 1204 M, Porto Alegre, Rio Grande do Sul) (490 golpes/min) por 3 min. Após homogeneização, alíquotas de 1 mL dos homogenatos foram transferidas para tubos contendo 9 mL de água peptonada (0,1% m/v) realizando-se diluições seriadas. Para analisar bactérias lácticas, fungos e leveduras, coliformes totais e termotolerantes foi utilizado o diluente água peptonada e para *Estafilococos* coagulase positiva citrato de sódio (2% m/v). Para *Salmonella* foi utilizada a água peptonada tamponada 0,1% (m/v) e para *Listeria monocytogenes* o Caldo Fraser.

4.2.2 Contagem de bactérias lácticas

Para contagem de bactérias lácticas realizou-se o plaqueamento em profundidade, no qual alíquotas de 1 mL das diluições adequadas foram transferidas para placas de Petri

estéreis com subsequente adição do ágar Man Rogosa and Sharpe (MRS) (Difco, Detroit, Michigan, Estados Unidos), seguida de homogeneização das placas e, após completa solidificação do meio, adição de uma sobrecamada. As placas foram então incubadas a 32°C por 72 horas em B.O.D (SOLAB científica, B.O.D. SL-200, Piracicaba, SP). Após esse período, realizou-se a contagem de colônias típicas, sendo o resultado expresso em unidades formadoras de colônias por grama de QMA (UFC/g).

4.2.3 Enumeração de fungos e leveduras

Para enumeração de fungos e leveduras, utilizou-se o plaqueamento em superfície no qual alíquotas de 0,1 mL das diluições 10^{-2} e 10^{-3} foram transferidas e espalhadas, com auxílio de alça de Drigalski, na superfície do Ágar Dicloran Rosa Bengala Cloranfenicol Base (DRBC). As placas foram incubadas a 28°C de 5 a 7 dias e os resultados expressos em unidades formadoras de colônias por grama (UFC/g).

4.2.4 Identificação de *Salmonella* spp.

Para identificação de *Salmonella* spp. foi realizado o pré-enriquecimento em que unidades analíticas de 10g dos queijos foram transferidas para sacos plásticos estéreis, nos quais foram adicionados 90 mL de água peptonada tamponada 1% (m/v) (BPW) , seguido de homogeneização (490 golpes/min) em Stomacher Metroterm® por 3 minutos e subsequente incubação a 37 °C por 24h. Após cultivo realizou-se o enriquecimento seletivo, no qual alíquotas de 0,1 mL foram transferidas para tubos contendo 10 mL de caldo Rappaport-Vassilidis Soja (RVS)(Acumedia, Baltimore, Estados Unidos) e 1mL para tubos contendo 10 mL de caldo Tetrionato Muller Kauffmann Novobiocina (MKTTn), os tubos foram incubados, respectivamente, a 41,5°C e 37°C por 24h. Após incubação, as alíquotas de cada tubo foram retiradas com auxílio de alça de repicagem, estriadas em ágar Enterico Hektoen (*Himedia*) e incubadas a 37°C±1°C por 24h. Colônias foram coletadas de forma aleatória e identificadas em MALDI-TOF MS (Matrix Assisted Laser Desorption Ionization Time Of Flight Mass Spectrometry).

4.2.5 Quantificação de coliformes

Para enumeração de coliformes totais e termotolerantes foi seguido o método da *American Public Health Association* (APHA) do Número Mais Provável. Na primeira etapa, no teste presuntivo, foi realizado a inoculação de três alíquotas de 1 mL das diluições

adequadas das amostras, em uma série de três tubos, contendo tubos de Durhan invertido e o meio de cultura caldo *Lauril SulfatoTryptose* (LST). Os tubos que apresentaram crescimento com produção de gás a partir da lactose presente no meio, após incubação em estufa a 35 °C por 48 h, foram considerados suspeitos (presuntivo) para presença de coliformes.

Para confirmação dos coliformes totais, uma alçada de cada tubo positivo do caldo LST foi transferido para tubos contendo o caldo Verde Brilhante Bile Lactose (VBBL, Himedia®), seguindo de incubação a 35°C por 24-48h, após esse período foram considerados tubos positivos para coliformes totais aqueles que apresentarem turvação e formação de gás. Os coliformes termotolerantes foram quantificados usando-se também a técnica do NMP. As alíquotas foram transferidas dos tubos positivos do teste presuntivo de coliformes totais, com auxílio de uma alça de repicagem para tubos contendo o meio de cultura caldo *Escherichia coli* (EC, Himedia®) adicionado de tubos de Durhan invertidos. Os tubos foram incubados a 45 °C, por 48h e foram considerados positivos aqueles que apresentaram turvação e formação de gás. Os tubos de EC positivos para coliformes termotolerantes são suspeitos da presença de *E. coli*. Desse modo, para confirmação uma alçada de cada tubo positivo foi estriada em placas de Petri contendo o meio de cultura Ágar Eosina Azul de Metileno (EMB) e incubadas a 35°C por 24h, após esse período colônias com características típicas de *E. coli* foram transferidas para placas contendo Ágar Tryptona de Soja (TSA), incubadas a 37°C por 24h e identificadas no MALDI-TOF MS.

4.2.6 Quantificação de estafilococos coagulase positiva

A quantificação de estafilococos coagulase positiva foi realizada pela transferência de alíquotas de 0,1 mL das diluições adequadas para placas de Petri contendo ágar Vogel Johnson suplementado com 1% (m/v) de telurito de potássio e espalhadas com auxílio de alça de Driglasky. Após o espalhamento, as placas foram incubadas a 37°C por 48 h. Colônias típicas e atípicas foram quantificadas e, cerca de 5 colônias, foram transferidas para caldo infusão cérebro coração (BHI) e incubadas a 37°C por 24 h. Após esse período, as alíquotas de 0,3 mL de cada cultura foram transferidas para tubos de ensaio contendo 0,5 mL de plasma de coelho-EDTA e incubados a 37°C por 4 h. De acordo com a formação de coágulo, os isolados foram classificados com 1+; 2+; 3+ e 4+. Apenas os isolados 3+ e 4+ foram considerados estafilococos coagulase positiva. Esses isolados serão identificados por MALDI-TOF MS.

4.2.7 Identificação de *Listeria monocytogenes*

Para análise de *L. monocytogenes* foram retirados 10 g de cada queijo e adicionados

em 90 mL de caldo Fraser e homogeneizado em homogeneizador tipo *Stomacher* Metroterm® (Metroderm, 1204 M, Porto Alegre, Rio Grande do Sul) (490 golpes/min) por 5 min. Após homogeneização, foram realizadas diluições em água peptonada 0,1% (m/v) das quais alíquotas de 0,1 mL das diluições adequadas foram inoculadas em placas contendo ágar Palcam que foram incubadas a 37°C por 24 a 48 h. Após o cultivo, cerca de 5 colônias suspeitas de serem *L. monocytogenes* foram coletadas aleatoriamente de cada placa e transferidas para tubos contendo Ágar Triptona de Soja (TSA+YE), incubadas a 37°C por 24h e identificadas no MALDI-TOF MS. Alíquotas da massa celular também foram transferidas com auxílio da alça de repicagem tipo agulha para tubos contendo Ágar Indol Sulfeto Motilidade (SIM), seguido de incubação a 37°C por 24h. Após a incubação foram verificadas a motilidade dos isolados de *L. monocytogenes*, sendo considerados motilidade positiva quando o crescimento apresentou característica de “guarda-chuva” no terço superior do ágar.

4.3 Preparo das amostras para identificação utilizando Maldi-Tof-MS (Matrix-assisted laser desorption/ionization - time of flight - mass spectroscopy)

Os isolados bacterianos foram identificados pela análise proteômica, seguindo o protocolo de extração padrão adaptado de Carvalho et al. (2017). Aproximadamente uma alçada de cultura bacteriana foi ressuspensa em 1,2 mL de solução de etanol 75%. A amostra foi centrifugada e o sobrenadante foi removido. Ao pellet formado, foram adicionados 50 µL de acetronitrila, ácido fórmico e água (50:35:15 v/v) e seguido da agitação em vórtex durante 1 min. Foi realizada uma segunda centrifugação e, logo após, 0,3 µL dos precipitados obtidos contendo as células lisadas, foram depositados em placa de 96 poços e secada em temperatura ambiente para análise no espectrômetro Maldi-tof Microflex LT (Bruker Daltonics, Bremen, Alemanha) e análise dos dados no software FlexControl (Versão 3.0).

4.3.1 Identificação dos isolados bacterianos por MALDI-TOF MS

Os isolados foram identificados usando o sistema Matrix Assisted Laser Desorption/Ionisation - Time Of Flight Mass Spectrometry (MALDI-TOF MS) (Microflex-Bruker Daltonics/BioTyper™). A cepa *Escherichia coli* K12 foi utilizada como padrão para a calibração externa do MALDI-TOF MS seguindo metodologia descrita por Lima-Neto et al. (2014). A metodologia de calibração do equipamento e método de análise de dados foram realizados conforme descrito por Carvalho et al. (2017). A identificação dos resultados foi expressa por BioTyper log (scores), indicando a similaridade da cepa desconhecida com o perfil disponível em bancos de dados do Maldi-tof MS.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os queijos Minas artesanais possuem uma microbiota variada, composta por microrganismos desejáveis e indesejáveis ao longo da maturação (MARTINS, 2018). Dentre as bactérias benéficas, existem as bactérias do ácido láticas (BAL), que contribuem com o aroma e sabor (RESENDE, 2010). Já os microrganismos indesejáveis indicam ausência de boas práticas de fabricação (BPF) ou de menor tempo de maturação do que é estabelecido pela Portaria Instituto Mineiro de Agropecuária (IMA) N° 2051, de 07 de abril de 2021. A Tabela 1 mostra os resultados das análises de fungos e leveduras, bactérias láticas, coliformes totais, coliformes termotolerantes, *E. coli*, estafilococos coagulase positiva, *Salmonella* e *Listeria monocytogenes*.

Tabela 1 - Contagens, presença ou ausência de microrganismos para os queijos Minas artesanais comercializados na região de Carrancas-MG, com diferentes tempos de maturação.

Microrganismos	Tempo de maturação (dias)	
	22	45
Fungos e leveduras (UFC/g)	$7,3 \times 10^5$	$3,3 \times 10^4$
Bactérias láticas (UFC/g)	$2,0 \times 10^7$	$1,8 \times 10^6$
Coliformes totais (NMP/g)	> 1.100	< 3×10^1
Coliformes termotolerantes (NMP/g)	> 1.100	< 3×10^1
<i>Escherichia coli</i> (NMP/g)	$1,1 \times 10^5$	Ausência
Estafilococos coagulase positiva (UFC/g)	$4,6 \times 10^4$	Ausência
<i>Salmonella</i> spp.	Ausência	Ausência
<i>Listeria monocytogenes</i>	Ausência	Ausência

Fonte: Da autora (2023)

Observou-se que para a contagem de fungos e leveduras, o queijo de 22 dias de maturação apresentou elevado número - 10^5 UFC/g. Já no de queijo de 45 dias de maturação, houve uma queda para 10^4 UFC/g. A portaria IMA N° 2033, de 23 de janeiro de 2021 não limita a quantidade de fungos e leveduras nos queijos Minas artesanais (BRASIL, 2022). Entretanto, conforme Pinto (2004), a presença de fungos e leveduras são até mesmo necessárias em queijos artesanais, desenvolvidos a partir do leite cru, tem propriedades lipolíticas e proteolíticas, mas em números excessivos podem causar a deterioração e desenvolver gostose sabores indesejáveis. Contribuem também para o sabor e textura desses produtos durante o processo biológico e, possivelmente, são provenientes da microbiota do leite cru, da sala de maturação e de outras partes do ambiente (Sobral et al., 2017). O número

elevado de fungos e leveduras apresentados neste trabalho indica que a produção do queijo foi realizada sob condições de higiene insatisfatórias e em um ambiente de alta umidade relativa, podendo assim afetar a qualidade e a vida útil do produto.

As contagens de bactérias lácticas apresentaram redução ao longo do período de maturação. Estas bactérias são responsáveis pela acidificação durante a maturação e dão a textura, sabor e aroma aos alimentos (CASTRO et al., 2016). Além dos aspectos sensoriais, são cruciais para a segurança do queijo, pois sintetizam vários compostos antimicrobianos, como ácidos láctico, peróxido de hidrogênio e bacteriocinas, que tornam o queijo um meio adverso a sobrevivência de microrganismos patogênicos como *S.aureus*, *E.coli*, *L.monocytogenes* (SANT'ANNA et al., 2017). As BAL são encontradas no fermento utilizado na elaboração do queijo, também conhecido como pingo, que é rico em nestas bactérias e são responsáveis pela fermentação e maturação.

Com relação aos coliformes totais, a amostra de 22 dias não esteve de acordo com a legislação, e para 45 dias apresentou-se dentro do exigido pela legislação. O contrário foi observado para coliformes termotolerantes na amostra de 22 dias que apresentou valores acima do limite de 500 NMP/g estipulados pela Portaria IMA Nº 2033, de 23 de janeiro de 2021, que pode indicar uma possível presença do principal agente patogênico deste grupo que é a bactéria *E. coli*. A portaria do IMA Nº 2033, de 23 de janeiro de 2021 estabelece valores para contagens de coliformes totais entre $1,0 \times 10^3$ e $5,0 \times 10^3$ UFC/g de queijo e, para coliformes termotolerantes, entre 1×10^2 e 5×10^2 UFC/g de queijo. Essas bactérias são indicadoras de segurança indicando a possível presença de microrganismos patogênicos causadores de toxinfecção alimentar. Sua alta contagem em alimentos pode estar relacionada a ausência de boas práticas de fabricação falhas no processo de higienização durante a ordenha, manipulação e limpeza e sanitização das instalações e equipamentos. Em contrapartida, o queijo de 45 dias apresentou baixa contagem de coliformes totais e termotolerantes o que fica evidente a importância de períodos maiores de maturação. Araújo (2004), verificou um percentual significativo de amostras de queijo Minas artesanal que excederam aos limites legais para contagens de coliformes a 35°C e coliformes a 45°C. Ressaltando a importância da adoção de boas práticas de fabricação, que é fundamental para minimizar essa contaminação.

Com relação a contagem de *E. coli*, apesar de não existir um padrão microbiológico para queijo Minas artesanal, observou-se que no queijo de 22 dias de maturação os valores ultrapassaram o limite máximo, para queijos de baixa umidade estabelecido pela IN 161/2022 da ANVISA, de 10^3 UFC/g. Pinto et al. (2016), em seu estudo com QMA também encontrou *E.coli* acima do permitido pela legislação vigente. Esses resultados podem ser explicados por métodos de produção manual, já que os QMA passam por uma série de manipulação, leite de baixa qualidade utilizado, problemas de higiene na ordenha, mastite do rebanho e presença de antibióticos

De acordo com a legislação vigente para QMA o limite máximo para estafilococos coagulase positivo é igual a 2×10^2 UFC/g. Nesse estudo o queijo de 22 dias apresentou contagem superior a esse valor, já no queijo de 45 dias não foi observado presença desse microrganismo. Portanto, o processo de maturação pode ter contribuído para redução de estafilococos coagulase positiva no queijo. Pinto et al. (2017), encontrou que grande parte dos QMA de Montes Claros-MG avaliados estavam acima do limite aceitável pela legislação. Dessa maneira a alta contagem pode indicar falha nas condições sanitárias, a higiene das mãos dos colaboradores está sendo feita de forma incorreta, os próprios manipuladores podem transportar esse microrganismo, armazenamento incorreto do produto final. A grande preocupação com a presença de estafilococos coagulase positiva em alimentos é devido a possível presença de *S. aureus*, já que contagens elevadas desse microrganismo são preocupantes, pois acima de 10^5 UFC/g, podem ter genes para causar um quadro de toxiose a saúde dos seres humanos (ARQUÉS et al., 2015).

Ambas as amostras de queijos analisadas apresentaram ausência de *Salmonella*, estando em conformidade com a legislação vigente para QMA.- Esse microrganismo deve estar ausente em alimentos, tendo em vista que se trata de um patógeno, potencialmente causador de toxinfecção para o homem, representando um perigo para a saúde pública. A ausência de *Salmonella*, pode ser explicada decorrente da ausência de *Salmonella* no leite cru, pois se faz necessário que o rebanho esteja doente ou que o manipulador seja o portador ou que a água utilizada no processamento não seja potável. A elevada contagem de coliformes fecais pode indicar a presença de *Salmonella*, porém não foi detectada a presença desse microrganismo nas amostras analisadas. Araújo (2004), em trabalhos realizados com queijo minas artesanal da região de Araxá encontrou *Salmonella* sp. em 7 das 37 amostras analisadas, enquanto Pinto (2004) não detectou a presença desse microrganismo em nenhuma das 33 amostras de queijo analisadas na região do Serro.

Durante a detecção de *L. monocytogenes* todas as placas apresentaram um pequeno crescimento de colônias características, mas apenas o queijo com 22 dias de maturação apresentou resultado positivo para o teste de motilidade. No entanto, ao submeter as colônias típicas a identificação utilizando-se da técnica de MALDI-TOF não foi detectada presença de *L. monocytogenes* nos queijos. Considerando que o queijo artesanal é produzido com leite cru e *L. monocytogenes* é um contaminante ambiental comum, a ausência identificada provavelmente se deve à competição entre os microrganismos com as bactérias lácticas presentes no queijo (NERO et al., 2008). Visto que é uma bactéria que pode crescer em temperaturas refrigeradas, se faz necessário manter o QMA em temperaturas adequadas durante a produção e armazenamento. Martins (2006), Pinto (2004) e Araújo (2004) não isolaram *Listeria* spp. em nenhuma das amostras de queijos Minas artesanais analisadas nas regiões do Serro e Araxá.

No entanto, apesar de não ter identificado *L. monocytogenes* e *Salmonella*, nas

amostras de QMA analisados, utilizando-se a técnica de identificação por MALDI TOF MS(Matrix Assisted Laser Desorption Ionization Time Of Flight Mass Spectrometry): foi possível identificar microrganismos como *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus* e *Candida parapsilosis*.

Pseudomonas aeruginosa é uma bactéria Gram-negativa, em forma de bastonetes retos ou ligeiramente curvos, não esporulada, que apresenta um ou mais flagelos polares. Podem ser encontradas no solo, em águas residuárias e no ar, sendo responsável pela deterioração de produtos lácteos (SILVA; JUNQUEIRA; SILVEIRA, 2010). É um bom indicador, por ser um microrganismo psicrotrófico, que se multiplica mesmo que o alimento seja mantido refrigerado. Essa espécie causa alterações nos alimentos ao produzirem enzimas que podem alterar as suas características como: formação de limo, descoloração e mau cheiro, o que diminui sua vida útil (RAMOS, 2013). A possível presença dessa bactéria no queijo de 22 dias de maturação pode estar associada a água de lavagem contaminada, ausência de limpeza periódica da caixa d'água e tratamento da água. Sabe-se que a água utilizada na propriedade é de poço artesianos e esta deve ser tratada. De maneira geral, possivelmente este pode ter sido um dos fatores que contribuíram com a presença desta bactéria. Dessa forma, é necessário a implementação de BPF em todo fluxograma de produção de queijos.

Enterococcus faecalis são cocos Gram-positivos aerotolerantes, pertencem ao grupo Lancefield D e podem crescer em NaCl e em condições alcalinas. Estão relacionados principalmente ao intestino humano. Os enterococos são usados como indicadores de água contaminada por fezes (JAY, 2005). Bactériocinas produzidas por *Enterococcus* têm atividade antimicrobiana contra bactérias Gram-positivas, incluindo bactérias formadoras de esporos e bactérias patogênicas como *Listeria* (FOULQUIÉ MORENO et al., 2006). Foi detectada a presença desse microrganismo nos dois tempos de maturação analisados, o que pode indicar falhas de higienização durante a produção e certa vulnerabilidade dos QMA à contaminação, já que esses não possuem conservantes e aditivos.

Staphylococcus aureus é uma bactéria esférica (coco) gram-positiva, aeróbia facultativa e catalase positiva, sensíveis ao calor. Desenvolvem-se bem na faixa de temperatura de 35°C a 45°C, com limites de pH entre 4,2 e 9,3 e a atividade de água mínima é de 0,85, suportando concentrações de até 25% de cloreto de sódio (SILVA et al., 2010).

Segundo Jay (2005), os estafilococos são encontrados no ar, poeira, esgoto, água, leite e alimentos ou em equipamentos de processamento de alimentos, superfícies em contato com o meio ambiente, pessoas e animais, sendo que pessoas e animais são os principais vetores. Os estafilococos estão presentes nas passagens nasais e em 50% no cabelo e na pele de pessoas saudáveis. *S. aureus* é uma importante fonte de contaminação de queijos artesanais já que os manipuladores e os animais são os principais reservatórios, além do processo de fabricação envolver uma extensa manipulação e serem mantidos à temperatura ambiente. Desse modo, observou-se a presença de estafilococos somente no queijo de 22

dias, mostrando que o processo de maturação reduz as contagens até o limite aceito. Soares *et al.* (2018), analisando o QMA produzido em Uberlândia-MG, observou contagens de *S. aureus* elevadas, acima do permitido pela legislação, ressaltando-se a importância de respeitar o tempo da maturação para a redução desse microrganismo.

Candida parapsilosis é um patógeno fúngico oportunista que têm sido associados a uma variedade de infecções, como candidemia, vaginite, endocardite, endoftalmite, artrite séptica e peritonite (NOSEK *et al.*, 2009). Causador de infecção sistêmica, que ocorre principalmente em pacientes oncológicos, pacientes internados em unidades de terapia intensiva e em recém-nascidos. A causa de seu aparecimento no queijo de 45 dias pode estar relacionada à falta de higiene das mãos dos operadores, utensílios e equipamentos aplicados durante o processamento, ou mesmo se o leite utilizado estiver contaminado, pois é um patógeno indesejado no queijo e pode afetar sua qualidade, causando alterações em seu sabor, cheiro e textura.

6 CONCLUSÃO

Com base nos dados obtidos das análises realizadas, foi possível perceber que os padrões microbiológicos não são satisfatórios para o queijo de 22 dias de maturação, que apresentou valores de coliformes totais e termotolerantes, *E.coli*, Estafilococos coagulase positiva acima do permitido pela legislação. Já para o queijo de 45 dias de maturação ele se manteve dentro do estabelecido pela legislação vigente.

REFERÊNCIAS

ABREU, A. N. I. Contagem microbiana e incidência de aflatoxina M1 em queijo ralado e requeijão comercializado em diferentes cidades do estado de Minas Gerais. Dissertação (mestrado em Ciência dos Alimentos), 68 p. – Universidade Federal de Lavras, Lavras. 2011.

ARAUJO, R.A.B.M. Diagnóstico socioeconômico, cultural e avaliação dos parâmetros físico-químicos e microbiológicos do queijo Minas Artesanal da região de Araxá. 2004. 148f. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de Viçosa, 2004.

ARQUÉS, J. L. *et al.* Antimicrobial activity of lactic acid bacteria in dairy products and gut: effect on pathogens. **BioMed Research International**, v. 2015, p. 1-9, 2015.

BAIROS, Jacqueline Valle et al. Análise de bolores e leveduras em queijos tipo minas comercializados em feira livre. **Higiene Alimentar**, v. 30, n. 254/255, 2016.

BERESFORD, T.; WILLIAMS, A. The microbiology of cheese ripening. In: FOX, P. F.; McSWEENEY, P. L. H.; COGAN, T. M.; GUEENE, T. P. (Ed.). **Cheese chemistry, physics and microbiology**, 3. ed. Amsterdam: Elsevier, 2004, p. 287-317, v. 1, General Aspects.

BRASIL. Agência Nacional De Vigilância Sanitária. **Instrução normativa n o 60 de 23 de dezembro de 2019**. Disponível em: <<https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/inspecao/produtos-vegetal/legislacao-1/biblioteca-de-normas-vinhos-e-bebidas/instrucao-normativa-ndeg-60-de-23-de-dezembro-de-2019.pdf/view>>. Acesso em: 01 maio. 2023.

BRASIL. *Salmonella* (Salmonelose). Ministério da Saúde. 2023. Disponível em:<<https://www.gov.br/saude/pt-br/assuntos/saude-de-a-a-z/s/salmonella-salmonelose>>. Acesso em 07 jul. 2023.

BRUMANO, E. C. C. Impacto do tipo de fermento endógeno na qualidade e tempo de maturação de queijo Minas artesanal produzido em propriedades cadastradas pelo IMA (Instituto Mineiro de Agropecuária) na região do Serro-MG. 158f. Tese (Doutorado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2016. Disponível em: <http://www.locus.ufv.br/handle/123456789/9940> Acesso em: 24 maio 2023..

CASTRO,R.D. et al. Lactic acid microbiota identification in water; raw milk, endogenous starter culture, and fresh Minas artisanal cheese from the Campo das Vertentes region of Brazil during dry and rainy seasons. **Journal of Dairy Science**, v. 99, n. 8, p. 6086–6096, ago. 2016.

CHAVES, A. V. S. D.; MONTEIRO, R. P.; MACHADO, R. L. P. Processo de Produção do Queijo Minas Artesanal. Embrapa (Empresa Brasileira de Agricultura e Pecuária), 2018.

CORRÊIA, FAF. Características do Patótipos de *E. coli* e implicações de *E. coli* patogênica para aves em achados de abatedouros frigorífico. Seminário Aplicados (Pós-Graduação em Ciência Animal). Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2012.

DE ANTÔNIO, M.B; BORELLI, B. A importância das bactérias lácticas na segurança e qualidade dos queijos Minas artesanais. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, v. 75, n. 3, p. 204-221, 2020.

DE SANT'ANNA, Felipe Machado et al. Avaliação do potencial probiótico de bactérias lácticas isoladas de queijo Minas artesanal produzido na região do Campo das Vertentes, Brasil. **International Journal of Dairy Technology** , v. 70, n. 4, pág. 592-601, 2017.

EMATER, Queijo Minas Artesanal dos Campos das Vertentes. EMATER-MG, 2012. FAEMG – FEDERAÇÃO DA AGRICULTURA E PECUÁRIA DO ESTADO DE MINAS GERAIS. **Produtoras de Queijos Minas Artesanais**. 2022. Disponível em: <

FOULQUIÉ MORENO, M. R., SARANTINOPOULOS, P.; TSAKALIDOU, E., DE VUYST, L. The role and application of enterococci in food and health. **International Journal of Food Microbiology**, v. 106 (1), p. 1-24, 2006.

FREITAS, M. A. Q.; MAGALHÃES, H. Enterotoxigenicidade de *Staphylococcus aureus* isolados de vacas com mastite. **Revista de Microbiologia**, v. 21, p. 315-319, 1990.

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

IPHAN – INSTITUTO DO PATRIMÔNIO HISTÓRICO ARTÍSTICO NACIONAL. **Modo Artesanal de Fazer Queijo de Minas**. 2008. Disponível em: <http://portal.iphan.gov.br/uploads/publicacao/Dossie_Queijo_de_Minis_web.pdf>. Acesso em 8 abril 2022.

IMA – INSTITUTO MINEIRO DE AGROPECUÁRIA (IMA). **Portaria Nº 1186, de 12 de dezembro de 2011**. Proíbe o uso de aditivos e coadjuvantes de tecnologia ou elaboração na fabricação do Queijo Minas Artesanal. Belo Horizonte, 2011. Disponível em: <<http://www.ima.mg.gov.br/component/search/?searchword=queijo+minas+artesan&ordering=&searchphrase=all>>. Acesso em 01 jul. 2023.

IMA, INSTITUTO MINEIRO DE AGROPECUÁRIA. Portaria nº 2033, de 23 de janeiro de 2021. **Dispõe sobre parâmetros e padrões físico-químicos e microbiológicos de alimentos de origem animal e água de abastecimento**. Belo Horizonte: INSTITUTO MINEIRO DE AGROPECUARIÁRIA, 2021 a.

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

JAY, JAMES M.; LOESSENER, MARTIN J.; GOLDEN, D. A. **Modern Food Microbiology**. 7° ed. San Marcos: Springer, 2005.

LEEDOM LARSON, K. R.; SPICKLER, A. R. 2013. **Salmonelose**. Traduzido e adaptado a situação do Brasil por Mendes RE e Sareta L. 2019. Disponível em <http://www.cfsph.iastate.edu/DiseaseInfo/factsheetspt.php?lang=pt>.

LOURENCO, A.; FRAGA-CORRAL, M.; COLLI, L.; MOLONEY, M.; DANAHER, M.; JORDAN, K. Determination of the presence of pathogens and anthelmintic drugs in raw milk and raw milk cheeses from small scale producers in Ireland. **Food Science and Technology**, v. 130, p. 1-7, 2020.

MARTINS, José Manoel. Características físico-químicas e microbiológicas durante a maturação do queijo minas artesanal da região do Serro. 2006

MARTINS, M. G. G. **Patógenos em queijos artesanais e os fatores de risco para sua ocorrência**. Trabalho de Conclusão (Especialista em Microbiologia) - Universidade Federal de Minas Gerais. Belo Horizonte, 2018.

MINAS GERAIS. Instituto Mineiro de Agropecuária –IMA. Lei n. 23157 de 18 de dezembro

de 2018. Dispõe sobre a produção e a comercialização dos queijos artesanais de Minas Gerais. Minas Gerais, 2018.

MINAS GERAIS. Instituto Mineiro de Agropecuária (IMA). Portaria IMA nº2.051, de 07 de abril de 2021. Define o período de Maturação do Queijo Minas Artesanal produzido nas microrregiões de Araxá, Campo das Vertentes, Canastra, Cerrado, Serra do Salitre, Serro e Triângulo Mineiro. Belo Horizonte, 07 de abril de 2021.

MINAS GERAIS. Instituto Mineiro de Agropecuária. Portaria nº 1.305, de 30 de abril de 2013. Diretrizes para a Produção do Queijo Minas Artesanal. Belo Horizonte: Instituto Mineiro de Agropecuária, 2013.

MENESES, J. N. C. Queijo Artesanal de Minas: Patrimônio Cultural do Brasil. Dossiê Interpretativo. 2006

MORATO, E. P. et al. Domestic cats constitute a natural reservoir of human enteropathogenic *Escherichia coli* types. **Zoonoses and public health**, v. 56, n. 5, p. 229-237, 2009.

NERO, L. A. et al. *Listeria monocytogenes* and *Salmonella* spp. in raw milk produced in Brazil: occurrence and interference of indigenous microbiota in their isolation and development. **Zoonoses and public health**, v. 55, n. 6, p. 299-305, 2008.

PINTO, M. S. **Diagnóstico socioeconômico, cultural e avaliação dos parâmetros físico-químicos e microbiológicos do queijo Minas artesanal do Serro**. 2004. 133 f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2004.

PINTO, Maximiliano Soares et al. Características físico-químicas e microbiológicas do queijo artesanal produzido na microrregião de Montes Claros-MG. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, 2016.

SOBRAL, Denise et al. Principais defeitos em queijo Minas artesanal: uma revisão. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, v. 72, n. 2, p. 108-120, 2017.

COSTA, H. H. S. et al. Probiotic potential of lactic acid bacteria isolated from minas artisanal cheese from Serra da Canastra, MG. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 65, p. 1858-1866, 2013.

RAMOS, Michelle Silva. Isolamento e caracterização de bacteriófagos para biocontrole de *Pseudomonas* spp. em queijo Minas Frescal. 2013.

RESENDE, M de S de. **Queijo Minas Artesanal da Serra da Canastra: Influência Da Altitude e do nível de adastramento das queijarias nas características físico-químicas e microbiológicas**. 2010. 72 f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) - Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2010

SENGUN, I.; YAMAN, D. B.; GONUL, S. Mycotoxins and mould contamination in cheese: a review. **World Mycotoxin Journal**, v. 1, n. 3, p. 291-298, 2008.

DA SILVA, Neusely et al. **Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos e água**. Editora Blucher, 2017.

SILVA, N. Manual de metodos de analise microbiologica de alimentos e agua. São Paulo: Varela, São Paulo. **Online: <https://bit.ly/2C7MfZT>**, 2010.

SOBRAL, D. et al. Principais defeitos em queijo Minas artesanal: uma revisão. **Revista Instituto Laticínios Cândido Tostes**. Juiz de Fora, v. 72, n. 2, p. 108-120, 2017.

SOARES, Driene Bastos et al. Análise sanitária e físico-química e adequação bacteriológica do queijo minas artesanal produzido em duas propriedades. **Ciência Animal Brasileira**, v. 19, 2018.

TORKAR, K. G.; VENGUŠT, A. The presence of yeasts, moulds and aflatoxin M1 in raw milk and cheese in Slovenia. **Food Control**, v. 19, n. 6, p. 570-577, 2008.

VERDES EM CANTOS POUSADA. Carrancas. 2023. Disponível em:<<http://trecosdeminas.com.br/novo/carrancas/>>. Acesso em 01 jul. 2023.

WANG, Y.; LU, L.; LAN, R.; SALAZAR, J. K.; LIU, J.; XU, J. Isolation and characterization of *Listeria* species from rodents in natural environments in China. **Emerging Microbes & Infections**, v. 6, n. 1, p. 1–6, 2017.

ZHENG, J., WITTOUCK, S., SALVETTI, E., FRANZ, C., HARRIS, H., MATTARELLI, P., et al. A taxonomic note on the genus *Lactobacillus*: description of 23 novel genera, emended description of the genus *Lactobacillus beijerinck* 1901, and union of Lactobacillaceae and Leuconostocaceae. **International Journal of Systematic and Evolucionary Microbiology**. v.70, p. 2782–2858, 2020.