

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA
GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA**

BÁRBARA PONCIANO ROSA

**CONTAGEM DE *Staphylococcus* spp., *Staphylococcus* COAGULASE POSITIVO,
Staphylococcus COAGULASE NEGATIVO, BOLORES E LEVEDURAS EM LEITE
CRU, SORO-FERMENTO E QUEIJO MINAS ARTESANAL EM DIFERENTES
TEMPOS DE MATURAÇÃO PRODUZIDO NA REGIÃO DO CERRADO**

**PATOS DE MINAS – MG
DEZEMBRO DE 2020**

BÁRBARA PONCIANO ROSA

CONTAGEM DE *Staphylococcus* spp., *Staphylococcus* COAGULASE POSITIVO, *Staphylococcus* COAGULASE NEGATIVO, BOLORES E LEVEDURAS EM LEITE CRU, SORO-FERMENTO E QUEIJO MINAS ARTESANAL EM DIFERENTES TEMPOS DE MATURAÇÃO PRODUZIDO NA REGIÃO DO CERRADO

Monografia apresentada ao Instituto de Biotecnologia da Universidade Federal de Uberlândia como requisito final para a obtenção do título de Bacharel em Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. Guilherme Ramos Oliveira e Freitas

Coorientadora: Carla Ferreira de Lima

PATOS DE MINAS – MG

DEZEMBRO DE 2020

BÁRBARA PONCIANO ROSA

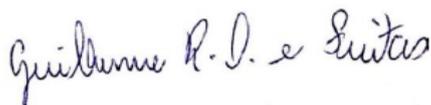
Contagem de *Staphylococcus* spp., *Staphylococcus* coagulase positivo, *Staphylococcus* coagulase negativo, bolores e leveduras em leite cru, soro-fermento e Queijo Minas Artesanal em diferentes tempos de maturação produzido na região do Cerrado

Monografia apresentada ao Instituto de Biotecnologia da Universidade Federal de Uberlândia como requisito final para a obtenção do título de Bacharel em Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. Guilherme Ramos Oliveira e Freitas

Coorientadora: Carla Ferreira de Lima

Banca examinadora:



Prof. Dr. Guilherme R. O. e Freitas – IBTEC/UFU
Presidente



Prof^a. Dr^a. Milla Gabriela dos Santos - FEQUI/UFU
Membro



Dr^a Daiane Silva Resende
Membro

Patos de minas, 04 de dezembro de 2020

RESUMO

O Brasil é um grande produtor de queijo, e nesse contexto, se destaca o Estado de Minas Gerais com a produção do Queijo Minas Artesanal (QMA). A utilização do soro fermento e o processo de maturação são etapas singulares na fabricação do QMA por serem responsáveis pelo sabor, cor e textura do produto. Cada microrregião produtora de QMA tem sua maneira característica de fabricação, o que dá ao queijo uma identidade própria. Por ser fabricado a partir do leite cru e bastante manipulado, o QMA permite a veiculação de bactérias potencialmente patogênicas ou de suas toxinas, podendo colocar a saúde do consumidor em risco, com ocorrência de infecções e intoxicações alimentares. Este trabalho teve como objetivo realizar a contagem microbiológica de *Staphylococcus* spp., *Staphylococcus* coagulase positivo, *Staphylococcus* coagulase negativo e bolores e leveduras em amostras de QMA produzido na microrregião do Cerrado, assim como do leite e do soro-fermento utilizados na sua fabricação. Para avaliar a influência do período de maturação na contagem dos microrganismos analisados foram analisados queijos de mesmo lote de fabricação com 1, 7, 10, 14 e 22 dias de produção.

Palavras-chaves: Queijo artesanal. Maturação. Qualidade microbiológica. Regiões produtoras de queijo. Legislação de queijos.

ABSTRACT

*Brazil is a major cheese producer, and in this context, the State of Minas Gerais stands out with the production of Minas artisanal cheese. The use of endogenous starter culture and the maturation process are unique steps in the manufacture of Minas artisanal cheese as they are responsible for the taste, color and texture of the product. Each region characterized as a producer of Minas artisanal cheese has its characteristic way of making, which gives the cheese its own identity. Because it is manufactured from raw and well-manipulated milk, Minas artisanal cheese allows the transmission of pathogenic bacteria or their toxins, which may put consumers' health at risk, with the occurrence of infections and food poisoning. This study aimed to evaluate the presence of *Staphylococcus* spp., Coagulase-negative staphylococci, Coagulase-positive staphylococci and molds and yeasts in samples of artisanal cheese produced in the Cerrado region during the rainy season, as well as the milk and the endogenous starter culture used in its manufacture. To demonstrate the influence of the maturation period on the count of the microorganisms analyzed, cheeses from the same production batch with 1, 7, 10, 14 and 22 days of production were evaluated.*

Keywords: *Artisanal cheese. Maturation. Microbiological quality. Cheese-producing regions. Cheese legislation.*

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABD: Agar Batata Dextrose

ABP: Agar Baird-Parker

BHI: *Brain Heart Infusion*

cm: centímetro(s)

EMATER-MG: Empresa de Assistência Técnica e Extensão Rural do Estado de Minas Gerais

g: grama(s)

IMA: Instituto Mineiro de Agropecuária

IPHAN: Instituto do Patrimônio Histórico e Artístico

kg: quilo(s)

MAPA: Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento

mL: mililitro(s)

nº: número

QMA: Queijo Minas Artesanal

S. aureus: *Staphylococcus aureus*

SCN: *Staphylococcus* coagulase negativo

SCP: *Staphylococcus* coagulase positivo

SEAPA: Secretaria de Agricultura Pecuária e Abastecimento de Minas Gerais

°C: graus Celsius

%: por cento

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1. Evolução da contagem mediana de *Staphylococcus* spp. (Log de UFC/g) em Queijo Minas Artesanal do Cerrado durante a maturação até 22 dias..... 27
- Figura 2. Evolução da contagem mediana de *Staphylococcus* coagulase positivo (Log de UFC/g) em Queijo Minas Artesanal do Cerrado durante a maturação até 22 dias..... 28
- Figura 3. Evolução da contagem mediana de *Staphylococcus* coagulase negativo (Log de UFC/g) em Queijo Minas Artesanal do Cerrado durante a maturação até 22 dias..... 31
- Figura 4. Evolução da contagem mediana de bolores e leveduras (Log de UFC/g) em Queijo Minas Artesanal do Cerrado durante a maturação até 22 dias..... 32

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1. Média, mediana e coeficiente de variação (CV) de *Staphylococcus* spp., *Staphylococcus* coagulase positivo, *Staphylococcus* coagulase negativo, bolores e leveduras observados em amostras de leite cru utilizado na fabricação de Queijo Minas Artesanal do Cerrado..... 22
- Tabela 2. Média, mediana e coeficiente de variação (CV) das contagens de *Staphylococcus* spp., *Staphylococcus* coagulase positivo, *Staphylococcus* coagulase negativo, bolores e leveduras observados em amostras de soro-fermento utilizado na fabricação de Queijo Minas Artesanal do Cerrado..... 24
- Tabela 3. Média, mediana e coeficiente de variação (CV) da contagem de *Staphylococcus* spp. encontrados em amostras de Queijo Minas Artesanal do Cerrado em diferentes dias de maturação..... 26
- Tabela 4. Média, mediana e coeficiente de variação (CV) da contagem de *Staphylococcus* coagulase positivo encontrados em amostras de Queijo Minas Artesanal do Cerrado em diferentes dias de maturação..... 28
- Tabela 5. Média, mediana e coeficiente de variação (CV) da contagem de *Staphylococcus* coagulase negativo encontrados em amostras de Queijo Minas Artesanal do Cerrado em diferentes dias de maturação..... 30
- Tabela 6. Média, mediana e coeficiente de variação (CV) da contagem de bolores e leveduras encontrados em amostras de Queijo Minas Artesanal do Cerrado em diferentes dias de maturação.....31

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	9
1.1 Microrregião do cerrado	11
1.2 Processo de produção do Queijo Minas Artesanal do Cerrado	12
1.3 Legislações do Queijo Minas Artesanal	13
1.4 Qualidade microbiológica do Queijo Minas Artesanal	14
1.4.1 <i>Staphylococcus</i> spp.	15
1.4.2 Bolores e Leveduras	17
2 OBJETIVOS	18
2.1 Objetivo geral	18
2.2 Objetivo específico	18
3 METODOLOGIA	18
3.1 Obtenção das amostras	19
3.2 Preparo das amostras	19
3.3 Contagem de <i>Staphylococcus</i> spp., <i>Staphylococcus</i> coagulase positivo e <i>Staphylococcus</i> coagulase negativo	19
3.4 Contagem de bolores e leveduras	21
3.5 Análise estatística	21
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	21
4.1 Contagem de microrganismos no leite.....	21
4.2 Contagem de microrganismos no pingo	24
4.3 Contagem de microrganismos no Queijo Minas Artesanal do Cerrado.....	25
4.3.1 <i>Staphylococcus</i> spp.	25
4.3.2 <i>Staphylococcus</i> coagulase positivo	27
4.3.3 <i>Staphylococcus</i> coagulase negativo	29
4.4.4 Bolores e leveduras	31
5 CONCLUSÃO	33
REFERÊNCIAS	35

1 INTRODUÇÃO

Minas Gerais tem suas principais atividades econômicas no setor agropecuário e é o maior produtor nacional de leite. No início, em consequência da grande produção de um alimento altamente perecível como é o leite, e por necessidade de maior escoamento do produto, cresceu a demanda para a fabricação de seus derivados, se destacando então a produção de queijo, especialmente os artesanais. Ainda hoje, a produção do Queijo Minas Artesanal (QMA) representa importante fonte de renda para produtores rurais (EMBRAPA, 2018).

O queijo artesanal é um derivado lácteo feito exclusivamente a partir do leite cru, retirado na própria propriedade rural, caracterizado pela produção familiar em pequena escala e pela técnica de fabricação. Dessa forma, ainda hoje mantém a tradição, história e importância socioeconômica envolvida em sua fabricação, além de gerar desenvolvimento local e regional (EMATER-MG, 2003). Dentro deste contexto, Minas Gerais se destaca como a maior produtora de queijo artesanal no Brasil, possuindo oito microrregiões caracterizadas como tradicionalmente produtoras do QMA: Serro, Canastra, Araxá, Cerrado, Campo das Vertentes, Serra do Salitre, Triângulo Mineiro e Serras da Ibitipoca (EMBRAPA, 2018; MINAS GERAIS, 2020a).

A microrregião do Cerrado abrange municípios com particularidades naturais e socioeconômicas em comum. As condições ambientais encontradas nessa área são referidas como favoráveis à produção do QMA pelo desenvolvimento de bactérias típicas capazes de promover o sabor marcante do queijo desta microrregião. Além disso, o queijo é a principal fonte de renda para muitos agricultores familiares, sendo, portanto, um aspecto expressivo na economia local (EMATER-MG, 2003).

O modo de fazer o QMA, declarado como patrimônio imaterial brasileiro em 2008 pelo Instituto do Patrimônio Histórico e Artístico Nacional (IPHAN), é caracterizado por, além da utilização do leite cru recém ordenhado, a adição do soro-fermento endógeno, comumente chamado de pingão, obtido das últimas gotas de dessora (FIGUEREIDO, 2018). Além disso, durante o processo de produção, a maturação é a etapa mais importante, uma vez que durante esse período ocorrem alterações significativas no sabor, cor e textura, favorecendo ainda a eliminação de bactérias potencialmente patogênicas e contribuindo para a permanência de microrganismos desejáveis no queijo (SALES, 2015).

Os queijos artesanais ainda são produzidos com a mesma técnica que deu sua origem, portanto é um alimento bastante manipulado. Isso, somado ao fato de possuir ingredientes como

o leite cru e o pingo, permite que o QMA veicule, além de bactérias benéficas responsáveis pelo processo de fermentação e formação de sabor e odor, bactérias potencialmente patogênicas e suas toxinas, o que pode colocar a saúde do consumidor em risco, com ocorrência de infecções e intoxicações alimentares (DORES, 2007; SALES, 2015; FIGUEREIDO, 2018). Desse modo, é necessário a adequação do queijo às normas higiênicas e sanitárias estabelecidas pela legislação atual.

A partir das legislações criadas como forma de preservar a identidade do queijo e estabelecer a segurança higiênico-sanitária do produto, a Secretaria de Agricultura Pecuária e Abastecimento de Minas Gerais (SEAPA) e a Empresa de Assistência Técnica e Extensão Rural do Estado de Minas Gerais (EMATER-MG) lançaram o Programa de Apoio aos Queijos Tradicionais de Fabricação Artesanal (SALES, 2015). Este programa propõe cadastrar os produtores, a fim de melhorar e controlar a qualidade e a produtividade de todas as queijarias das regiões tradicionalmente produtoras, de forma a aproveitar e valorizar o potencial de mercado do queijo mineiro e promover a segurança alimentar dos queijos comercializados (EMATER, 2014).

A Resolução nº 07, de 28 de novembro de 2000 definiu que o QMA só poderia ser comercializado após o prazo mínimo de 60 dias de maturação (BRASIL, 2000). Posteriormente, o Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA) editou a Instrução Normativa nº 57, de 15 de dezembro de 2011, na qual permite a venda de QMA com prazo de maturação inferior, desde que estudos técnicos científicos, para cada região tradicionalmente produtora, comprovem que a redução deste prazo não comprometa a qualidade e a segurança alimentar do queijo (BRASIL, 2011).

Em 2013, a portaria nº 1.305 estabeleceu diretrizes para o tempo de maturação do QMA e ficou definido como o período mínimo de maturação de Queijo Minas Artesanal como 17 dias para a microrregião do Serro, 22 dias para as microrregiões da Canastra, Cerrado, Araxá e do Campo das Vertentes, até que sejam realizadas novas pesquisas que ratifiquem ou retifiquem os referidos tempos de Maturação (MINAS GERAIS, 2013).

Atualmente, a portaria nº 1.305 de 2013 está revogada pela Portaria IMA nº 1969 de 2020, entretanto, a mais recente ainda define que o período mínimo de maturação do queijo Minas Artesanal para as regiões do Estado, caracterizadas ou não como produtoras de QMA, que não possuem período indicado por pesquisa científica, é de 22 (vinte e dois) dias, por ser o maior período especificado em estudos científicos de outras regiões (MINAS GERAIS, 2020b).

A microrregião do Cerrado ainda não possui nenhum estudo que embase uma legislação específica para o seu tempo de maturação ideal, o que pode implicar na comercialização tardia

ou precoce do QMA da região. Neste contexto, o presente trabalho tem o objetivo realizar a contagem de *Staphylococcus* spp., *Staphylococcus* coagulase positivo, *Staphylococcus* coagulase negativo, bolores e leveduras em amostras de Queijo Minas Artesanal do Cerrado, assim como do leite cru e o soro-fermento utilizados em sua fabricação, além de analisar o efeito da maturação sobre a contagem destes microrganismos.

1.1 Microrregião do Cerrado

A microrregião do Cerrado, ou do Alto Paranaíba, como era conhecida até 2007 (MINAS GERAIS, 2007), localiza-se a oeste do estado mineiro, é considerada privilegiada por possuir solos férteis, água em abundância, chuvas bem distribuídas entre outubro e março e clima ameno. É composta pelos municípios de Abadia dos Dourados, Arapuá, Carmo do Paranaíba, Coromandel, Cruzeiro da Fortaleza, Guimarães, Lagamar, Lagoa Formosa, Matutina, Patos de Minas, Patrocínio, Presidente Olegário, Rio Paranaíba, Santa Rosa da Serra, São Gonçalo do Abaeté, São Gotardo, Tiros, Vazante e Varjão de Minas (EMATER-MG, 2003).

Tendo a agropecuária como sua principal fonte econômica, a história da fabricação e consumo do QMA do Cerrado se confunde com a história de seu povoamento, e já por mais de dois séculos comercializa leite e queijos. A princípio, o queijo foi uma opção para se adaptar à alta perecibilidade do leite, permitindo maior tempo de armazenamento, se tornando tradicionalmente um alimento fino para servir à mesa e ingrediente de inúmeras receitas (IPHAN, 2014).

O sabor, tamanho, cor e textura são os atributos que mais se diferem quando comparado os queijos das oito microrregiões tradicionalmente produtoras do Queijo Minas Artesanal. De modo geral, as características sensoriais do QMA são conferidas pelos microrganismos que fazem parte da microbiota natural do leite e do pingo utilizados em sua produção. Estes, por sua vez, variam de acordo com o clima, alimentação do rebanho, tipo de processamento, manipulação do produto e outros fatores envolvidos e por isso, a singularidade do queijo de cada região (EMBRAPA, 2018).

O QMA do Cerrado tem consistência semidura à macia, natureza amanteigada, textura compacta, cor branca amarelada com crostas finas, amareladas e sem trincas, formato cilíndrico, com 4 a 6 cm de altura e 15 a 17 cm de diâmetro. Costuma pesar entre 1,0 kg e 1,2 kg, com odor e sabor marcante, ligeiramente ácido (EMATER-MG, 2003).

1.2 Processo de produção do Queijo Minas Artesanal do Cerrado

A fabricação de queijo a partir do leite cru é uma atividade tradicional presente no cotidiano de inúmeras fazendas de Minas Gerais (IPHAN, 2014). O regulamento da Portaria IMA N° 1969 de 26 de março de 2020, que dispõe a produção de Queijo Minas Artesanal, o define como o queijo produzido na propriedade de origem do leite, à partir do leite cru, hígido, integral e recém ordenhado, utilizando-se na sua coagulação somente a quimosina de bezerro pura, e no ato da prensagem somente o processo manual (MINAS GERAIS, 2020b).

Antes de se iniciar a fabricação do queijo, é necessário a obtenção da matéria prima, o leite. Este deve ser proveniente de um rebanho sadio, o qual deve passar por constantes testes para comprovar ausência de zoonoses. O fato de o leite não passar por nenhum tratamento térmico exige um controle rigoroso quanto à sanidade do rebanho e as condições higiênicas do momento da ordenha até o processamento do queijo (EMBRAPA, 2018)

Oficialmente, por lei, o processo de produção do QMA compreende dez principais fases: filtração; adição do fermento natural (pingo) e coalho; coagulação; corte da coalhada; mexedura; dessoragem; enformagem; prensagem manual; salga seca e maturação (MINAS GERAIS, 2020b). Do início desse processo até a etapa de maturação pode levar de três a quatro dias, e o controle durante todo o processamento do queijo é imprescindível para a obtenção de um produto com as características desejadas (EMBRAPA, 2018).

A primeira fase da produção do QMA é a filtragem do leite, com o objetivo de separar partículas macroscópicas. O ideal é que a coagem seja feita primeiro logo após a ordenha e depois novamente ao entrar na queijaria. Depois, para a produção da massa do queijo é adicionado fermento natural e coalho (MINAS GERAIS, 2020b). O soro-fermento utilizado é o chamado pingo, composto por bactérias lacto fermentativas típicas de cada microrregião e obtido com o soro que escorre dos queijos manufaturados no dia anterior, durante o seu primeiro dia de maturação. O pingo é condicionado pelo clima, tipo de solo e pastagens de cada região, sendo responsável pelo padrão de consistência, cor e sabor específico dos queijos (IPHAN, 2014).

O tempo necessário para o coalho atuar no leite é chamado de coagulação e precede a fase do corte da coalhada, que juntamente com a mexedura visam a separação do soro. O excesso do soro é retirado na dessoragem, e a quantidade retirada varia de região para região. Na enformagem as massas são colocadas em formas redondas para ganhar o seu formato característico e então passa pela prensagem, etapa obrigatoriamente manual, necessária para unir os grãos de queijo. A massa enformada recebe o sal numa das superfícies e depois de

algumas horas vira-se o queijo e repete-se o processo. O pingo é colhido e então inicia-se a maturação (MINAS GERIAS, 2020b; EMATER, 2003).

A maturação é a etapa mais importante em todo o processo de produção do QMA, e corresponde à fase de transformações físicas, químicas e microbiológicas. Por isso, requer conhecimentos, espaço próprio e adequado, condições controladas e tempo mínimo definido. De modo geral, o processo de maturação depende de quatro principais fatores: temperatura, umidade, composição e microbiota (EMBRAPA, 2018; MARTINS, 2006). Os dias de maturação favorecem uma combinação de fatores fundamentais para estabilidade e segurança alimentar do queijo e desta forma, pode reduzir populações de microrganismos indesejáveis. Entretanto, não deve ser utilizada como única etapa para garantir a eliminação de patógenos, e para isso é necessário controle, higiene e boas práticas durante toda a fabricação do queijo artesanal (FIGUEIREDO, 2018).

1.3. Legislações do Queijo Minas Artesanal

O QMA, como todo produto alimentício, possui um conjunto de legislações, para regulamentar sua produção e comercialização. Minas Gerais é o Estado com maior volume de queijos produzidos e produtores envolvidos na venda de queijos fabricados com leite cru e é também, o que mais tem criado normas e leis para esse segmento (EMBRAPA, 2018).

Apesar da prática de produzir queijo artesanal existir por várias décadas, somente em 2002, foi regulamentada a lei nº 14.185, aprovada pelo decreto nº 42.645, de 5 de junho de 2002, que dispõe sobre o processo de produção do QMA. A lei, determinou padrões microbiológicos de qualidade para processamento do queijo, obtenção da matéria-prima e da água utilizada, e ainda faz referência ao controle sanitário do rebanho, a estrutura da queijaria, os equipamentos utilizados, o transporte e comercialização (MINAS GERAIS, 2002a; MINAS GERIAS, 2002b).

Embora, trouxesse grande avanço para a mobilização da regularização do QMA no Estado, alguns dos padrões microbiológicos e o percentual de umidade do queijo estabelecidos pela lei nº 14.185 não eram compatíveis com a Portaria nº 146, de 07 de março de 1996. Por isso foi publicado o Decreto Estadual nº 44.864 de 1º de agosto de 2008 que alterou o regulamento da Lei nº 14.185 (BRASIL, 1996; MINAS GERAIS, 2002a; MINAS GERAIS 2008).

Em 2011, a Instrução Normativa n.º 57, de 15 de dezembro de 2011 permitiu a venda com prazo inferior a 60 dias, desde que estudos técnicos científicos, para cada região tradicionalmente produtora do QMA, comprovem que a redução deste prazo não comprometa a qualidade e a segurança alimentar do queijo, garantindo condições de valores de umidade e contagens microbiológicas dentro dos limites permitidos (BRASIL, 2011).

Em Minas Gerais, foi sancionada, em 2012 a Lei nº 20.549, que dispõe sobre a comercialização dos queijos artesanais mineiros e incluiu como artesanais outros tipos de queijo, como o meia cura, cabacinha e requeijão artesanal (MINAS GERAIS, 2012). Justamente a tentativa de ampliar os queijos considerados artesanais e beneficiar mais produtores com esta inclusão criou um entrave na nova regra, gerando confusão na regulamentação e dificultando a formação da identidade do QMA (EMBRAPA 2018). Ficou então revogada a Lei nº 20.549, com a publicação da Lei nº 23.157 de 18 de dezembro de 2018, que dispôs sobre a produção e a comercialização dos queijos artesanais de Minas Gerais e definiu como queijo artesanal o queijo elaborado com leite integral fresco e cru e com características de identidade e qualidade específicas (MINAS GERAIS, 2018a).

Em 2018, a Portaria IMA nº 1837 regulamentou parâmetros e padrões físico-químicos e microbiológicos de produtos de origem animal, revogando a Portaria IMA nº 1670, de 29 de outubro de 2016 (MINAS GERAIS, 2018b; MINAS GERAIS 2016).

Em 26 de março de 2020, a Portaria IMA nº 1969, dispõe sobre a produção de Queijo Minas Artesanal em queijarias e entrepostos localizados dentro de microrregiões definidas e para as demais regiões do Estado, caracterizadas ou não como produtora de QMA, e considerando a necessidade de estabelecer normas faz considerações sobre o processamento, fabricação, maturação, identificação e comercialização do QMA (MINAS GERAIS, 2020b).

1.4 Qualidade microbiológica do Queijo Minas Artesanal

O QMA é considerado um alimento vivo, devido à presença de uma microbiota natural complexa e dinâmica em sua composição. Os microrganismos do queijo podem ser definidos como desejáveis e indesejáveis, sendo os desejáveis responsáveis por importantes aspectos sensoriais como sabor, textura e aroma do queijo. Já os microrganismos indesejáveis representam risco de infecções e intoxicações alimentares ao consumidor (FIGUEIREDO, 2018).

O leite é muito rico em nutrientes e contém uma microbiota diversificada, responsável pelo processo de fermentação e alterações durante a maturação do queijo. Entretanto, por ser

utilizado sem nenhum tratamento térmico, quando a qualidade do leite é ruim, pode servir como fonte de contaminação de patógenos e conseqüentemente o queijo apresentará características microbiológicas insatisfatórias (SALES, 2015; FIGUEIREDO, 2018).

O pingão, ingrediente obrigatório no Queijo Minas Artesanal, é proveniente da dessora do queijo do lote anterior, e, portanto, resultante da interação da microbiota com o soro lácteo (MINAS GERAIS, 2012). De modo geral, as altas contagens de bactérias ácido lácticas do pingão competem com os microrganismos indesejáveis, diminuindo sua contagem ao longo da maturação. Além disso, uma vez que o pingão é coletado após a salga dos queijos, é comum que o pingão com sal seja utilizado para inibir o crescimento desses microrganismos (FIGUEREIDO, 2018). Entretanto, ainda assim, o pingão pode representar um potencial fonte de contaminação ao QMA, já que alguns microrganismos, como o *Staphylococcus* spp. são tolerantes ao sal (HENNEKINNE et al., 2012).

Outro fator que pode levar à contaminação do queijo artesanal, é seu método de produção, que conta com intensa manipulação durante todo o processamento e maturação. A fim de impedir a contaminação do QMA os produtores devem seguir uma série de requisitos sanitários da legislação que incluem estrutura física adequada, limpeza de utensílios e equipamentos, cursos de boas práticas de fabricação, exames de saúde dos manipuladores, vacinas e testes de sanidade do rebanho, e análises frequentes do leite (MINAS GERAIS, 2002a; SALES, 2015).

1.4.1 *Staphylococcus* spp.

Os *Staphylococcus* spp. são cocos Gram positivos, anaeróbios facultativos, produtores de catalase, não-esporulados e geralmente não-encapsulados, β - hemolíticos, maltose e manitol positivos e formadores de colônias pigmentadas, e que quando observadas ao microscópio, frequentemente ocorrem em aglomerados semelhantes a cachos de uvas. São tolerantes a elevadas concentrações de sal e nitratos e podem ser encontradas no solo, na água, nos homens e nos animais (HENNEKINNE et al., 2012). Os *Staphylococcus* spp. podem ser subdivididos em coagulase positivo e coagulase negativo. As espécies coagulase positivo são reconhecidas como importantes patógenos devido a capacidade que enzima coagulase tem de coagular o plasma sanguíneo (MARQUES et al., 2006).

Números elevados de *Staphylococcus* coagulase positivo (SCP) em uma amostra, podem representar potencial perigo devido a sua capacidade de produção de enterotoxinas estafilocócicas, que se consumidas podem gerar quadros de intoxicação alimentar. A

intoxicação alimentar estafilocócica é uma das doenças mais comuns transmitidas por alimentos. Dentre as espécies reconhecidas como SCP, a mais importante é *Staphylococcus aureus*, sendo relacionada com uma série de infecções e intoxicações no ser humano e nos animais. (MARTINS, 2006; MELO, 2011).

Se tratando de produtos derivados do leite, como o queijo, o *S. aureus* destaca-se como agente de contaminação, por ser frequentemente associado à inflamação da glândula mamária ou mastite de origem bacteriana no rebanho leiteiro. A mastite é considerada como a doença que proporciona as maiores perdas econômicas na produção de leite, e quando associada ao *S. aureus*, possui um tratamento mais difícil devido à sua elevada resistência aos antibióticos (FAGUNDES e OLIVEIRA, 2004).

Sabe-se que em infecções intramamárias, *S. aureus* possui maior habilidade para formação de biofilmes, ou seja, os microrganismos encontram-se aderidos a uma superfície e envolvidos por uma matriz de polímeros orgânicos. A formação de biofilmes contribui para maior proliferação e contaminação dos equipamentos de ordenha, além da formação de biofilmes nos mesmos, sendo ainda mais acelerada pela higienização inadequada destes equipamentos e seus manipuladores (MELO, 2011). No caso das mastites, além de auxiliar na colonização e aderência ao epitélio da glândula mamária, a produção de biofilme protege as bactérias do sistema imune do hospedeiro e da ação de antimicrobianos, o que contribui para manutenção da forma subclínica da doença, e aumenta as perdas decorrentes da má qualidade do leite (CASTILHO, 2016).

S. aureus também pode ser considerado um microrganismo indicador de contaminação alimentar, pois quando presente em altas contagens no alimento pode indicar problemas de processamento, higienização inadequada de equipamentos e/ou manipuladores e temperaturas de estocagem incorretas, sugerindo contaminação por outros microrganismos igualmente indesejáveis (FEITOSA et al., 2017).

Os padrões microbiológicos estabelecidos pela Portaria IMA N° 1837, de 5 de julho de 2018 para produção de QMA determinam que a contagem máxima de *Staphylococcus coagulase positivo* no queijo seja de $1,0 \times 10^3$ UFC/g (MINAS GERAIS, 2018b). O limite de $1,0 \times 10^2$ UFC/mL para *Staphylococcus aureus* presente no leite cru utilizado em sua fabricação é disposto no Decreto n° 42.645 de 2002 que regulamenta a lei de mesmo ano (MINAS GERAIS, 2002b). Apesar desta lei já estar revogada, seus parâmetros continuam sendo utilizados como base para as pesquisas com QMA, uma vez que o regulamento vigente não apresenta parâmetros microbiológicos para o leite cru.

Espécies de *Staphylococcus* coagulase negativo (SCN) também são comumente encontradas em alimentos fermentados, inclusive em queijos, já que esses microrganismos são tolerantes ao ácido e ao sal (RAFAEL, 2017). Por constituírem a maior parte da microbiota natural da pele de humanos e animais, há possibilidade de sua presença com altas contagem em alimentos frequentemente manipulados durante seu preparo e produção (VIEIRA, 2017). Entretanto, ainda que alguns estudos relatem estirpes que apresentam fatores de virulência para produção de enterotoxinas (SOBRAL,2012), não há legislação para determinação de limites para SCN em QMA.

1.4.2 Bolores e leveduras

Os bolores e leveduras são microrganismos essenciais para o sabor de algumas variedades de queijos por possuírem propriedades lipolíticas e proteolíticas. No caso do QMA não é diferente, fazem parte da microbiota do queijo e durante a maturação contribuem para o sabor e textura. Entretanto, em contagens elevadas podem contribuir para deterioração do produto, e por esta razão podem se comportar como microrganismos indesejáveis (SALES, 2015).

Apesar da valorização e boa aceitação dos queijos com microbiota fúngica na gastronomia, a legislação referente aos atributos microbiológicos do QMA não determina a contagem máxima deste microrganismo, não indica a identificação das espécies envolvidas e nem suas interações com o queijo. Questionamentos sanitários em relação a bolores e leveduras são coerentes uma vez que a ação indesejada deste microrganismo pode levar a produção de gás, alterações na cor do queijo, e proporcionar um sabor desagradável, assim como pode ser importante para garantir o sabor, aroma e textura do tradicional queijo artesanal mineiro (FIGUEIREDO, 2018).

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Realizar a contagem de *Staphylococcus* spp., *Staphylococcus* coagulase positivo, *Staphylococcus* coagulase negativo, bolores e leveduras em amostras de Queijo Minas Artesanal produzido na microrregião do Cerrado em diferentes períodos de maturação (tempo 1, 7, 10, 14 e, 22 dias), assim como no leite cru e no soro-fermento utilizados na sua fabricação.

2.2 Objetivos específicos

- Avaliar contagem de *Staphylococcus* spp., *Staphylococcus* coagulase positivo, *Staphylococcus* coagulase negativo e bolores e leveduras no leite cru, soro-fermento e Queijos Minas Artesanais produzidos na microrregião do Cerrado.
- Avaliar o efeito da maturação dos Queijos Minas Artesanais do Cerrado sobre a contagem de *Staphylococcus* spp., *Staphylococcus* coagulase positivo, *Staphylococcus* coagulase negativo e bolores e leveduras.

3 METODOLOGIA

As análises microbiológicas foram realizadas utilizando as metodologias descritas na Instrução Normativa N° 62, de 26 de agosto de 2003, do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), que dispõe dos Métodos Analíticos Oficiais para Análises Microbiológicas para Controle de Produtos de Origem Animal e Água (BRASIL, 2003). Os parâmetros microbiológicos foram analisados de acordo como a Portaria N° 1837, de 5 de julho de 2018, do Instituto Mineiro de Agropecuária (IMA) que se referem aos Padrões e Parâmetros Físico-Químicos e Microbiológicos de Produtos de Origem Animal e da Água de Abastecimento (MINAS GERAIS, 2018b).

3.1 Obtenção das amostras

A seleção dos produtores, coleta e transporte das amostras foi conduzida pela Empresa de Assistência Técnica e Extensão Rural (EMATER-MG) de Patos de Minas. Foram selecionados, aleatoriamente, 11 produtores com registro de inspeção no IMA e as coletas foram realizadas durante o período das chuvas, entre os meses de outubro e dezembro de 2019, seguindo os procedimentos definidos pela EMATER-MG. Em cada propriedade escolhida, foram coletadas amostras de queijo, leite cru e soro-fermento. Para análise em diferentes períodos de maturação, os queijos foram coletados com 1, 7, 10, 14 e 22 dias de maturação, totalizando cinco coletas do mesmo lote de fabricação. Após as coletas, as amostras foram transportadas, acondicionadas em caixas térmicas, até o Laboratório de Microbiologia da Universidade Federal de Uberlândia, campus Patos de Minas, onde foram realizadas todas as avaliações microbiológicas.

3.2 Preparo das amostras

Para a obtenção da diluição inicial de 10^{-1} , alíquotas de 25mL de leite ou soro-fermento, foram adicionadas à 225 mL de água peptonada (0,1%, *Acumedia*, *Neogen*) esterilizada. Para as amostras de queijo, com auxílio de pinças e bisturis esterilizados, foram retirados e pesados 25 gramas (g), e em seguida foram desintegrados mecanicamente em um liquidificador com copo limpo e esterilizado e, então, adicionadas à 225 mL de água peptonada (0,1%). Após a homogeneização das amostras, novas diluições decimais seriadas foram obtidas adicionando 1 mL da diluição anterior em 9 mL de água peptonada esterilizada (0,1%). A quantidade de diluições foi determinada em função do nível estimado de contaminação da amostra, de forma a serem obtidas placas com 20 a 200 unidades formadoras de colônias (UFC) para *Staphylococcus* spp. e placas com 15 a 150 UFC para bolores e leveduras.

3.3 Contagem de *Staphylococcus* spp., *Staphylococcus* coagulase positivo e *Staphylococcus* coagulase negativo

Para a contagem presuntiva de *Staphylococcus* coagulase positivo e *Staphylococcus* coagulase negativo foi utilizado o método de contagem em placas. Para isso, as diluições de escolha foram inoculadas, em triplicata, em placas de Petri com Agar Baird-Parker (ABP) (*Acumedia*, *Neogen*) enriquecido com emulsão de gema de ovo e telurito de potássio

(*Laborclin*). O inóculo foi espalhado com auxílio de uma alça de Drigalsky até que todo o excesso de líquido fosse absorvido pelo meio. Posteriormente, as placas foram incubadas invertidas, a 36 °C (± 1) por 30 a 48 horas. Após esse período, foi realizada a contagem das colônias, selecionando a diluição com placas que continham entre 20 e 200 colônias.

São consideradas colônias com aspecto típico do gênero *Staphylococcus* aquelas pretas brilhante, com anel opaco, circulares, lisas, convexas e com halo claro ao seu redor. Já as colônias de aspecto atípico são acinzentadas ou negras brilhantes sem halo ou com apenas um dos halos. A contagem de cada tipo de colônia foi registrada separadamente e para a confirmação, foram selecionadas de 3 a 5 colônias típicas e atípicas para realização dos testes confirmativos: coloração de Gram, prova da catalase e teste da coagulase.

Na coloração de Gram, foi preparado esfregaços em lâminas das colônias, onde foram adicionados alternadamente: cristal violeta, lugol, etanol e fucsina. Após o uso de cada corante ou solução descorante, foi realizada lavagem com água destilada imediatamente após o tempo de ação de cada solução (60, 60, 15 e 30 segundos, respectivamente). A lâmina então foi levada ao microscópio para observação das características morfotinturiais. A presença de cocos Gram positivos indica a necessidade da realização dos próximos testes para confirmação.

Para o teste da catalase foram retiradas colônias típicas e atípicas do cultivo em ABP e transferidas para uma lâmina contendo uma gota de peróxido de hidrogênio a 3%. Então, foi observada a produção imediata ou não de bolhas, sendo que a presença de bolhas indica prova positiva para catalase. Bactérias do gênero *Staphylococcus* são catalase positivas.

O teste para atividade da coagulase foi realizado em tubos utilizando plasma de coelho hidratado com solução salina (Coagu-Plasma, *Laborclin*). Para isso, de três a cinco colônias típicas e atípicas foram selecionadas do cultivo em ABP e inoculadas em caldo *Brain Heart Infusion* (BHI) e em seguida incubadas a 36 °C (± 1) por 18 a 24 horas. Posteriormente, 0,3 mL da cultura foram transferidos para um tubo de ensaio com 0,3 mL de plasma de coelho liofilizado. Após a homogeneização as amostras foram incubadas a 36 °C (± 1) e observadas após 24 horas para confirmação da positividade com a formação de coágulo. As amostras com a presença de coágulos grandes e organizados que se desprendem ou não quando o tubo é invertido foram consideradas coagulase positivas.

Para os resultados, foram consideradas bactérias *Staphylococcus* spp. os cocos Gram positivos e catalase positivos, e entre estas, as colônias positivas no teste da coagulase foram denominadas *Staphylococcus* coagulase positivo e as de resultado negativo *Staphylococcus* coagulase negativo.

3.4 Contagem de bolores e leveduras

As diluições de escolha de cada amostra foram inoculadas, em triplicata, em placas de Petri com Agar Batata Dextrose 2% (ABD), acidificado com ácido tartárico 10% em pH 3,5. O inóculo foi espalhado com auxílio de uma alça de Drigalsky até que todo o excesso de líquido foi absorvido pelo meio. Posteriormente, as placas foram incubadas a 25 °C (± 1) por sete dias. Após esse período foi realizada a contagem das colônias, selecionando a diluição com placas que continham entre 15 e 150 colônias. Todas as colônias contadas foram consideradas representativas para bolores e leveduras.

3.5. Análise estatística

Foi utilizado o software Graph Pad Prism (v.6) para a análise dos resultados. Os resultados das análises microbiológicas encontrados para cada um dos 11 produtores foram considerados como repetições. Foram calculadas as médias, medianas, log das medianas e o coeficiente de variação (CV) dos valores obtidos nas análises das amostras de leite cru e soro-fermento. Para as amostras de QMA, esses cálculos foram realizados para cada período de maturação analisado (1, 7, 10, 14 e 22 dias), sendo os valores comparados entre si através do teste ANOVA, e pós-teste de Tukey para variáveis paramétricas (médias), e pós-teste de Kruskall-Wallis para variáveis não paramétricas (medianas). Foram consideradas diferenças estatisticamente significantes quando $p < 0,05$.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Contagem de microrganismos no leite

Na Tabela 1 são apresentadas as médias, as medianas e os coeficientes de variação (CV) das contagens de microrganismos presentes nas amostras de leite cru utilizado na fabricação do QMA da microrregião do Cerrado.

Pode-se observar que as medianas de *Staphylococcus* spp., *Staphylococcus* coagulase positivo e *Staphylococcus* coagulase negativo apresentaram valores na ordem de 10^4 , e as médias variaram entre $6,49 \times 10^3$ até $3,25 \times 10^4$ UFC/mL. De acordo com dados observados na

literatura, é normal que seja observado na época de chuvas uma maior quantidade de microrganismos no leite cru, uma vez que temperaturas mais altas associadas a maior umidade relativo do ar contribuem para a proliferação bacteriana (FIGUEIREDO, 2018).

Tabela 1. Média, mediana e coeficiente de variação (CV) de *Staphylococcus* spp., *Staphylococcus* coagulase positivo, *Staphylococcus* coagulase negativo, bolores e leveduras observados em amostras de leite cru utilizado na fabricação de Queijo Minas Artesanal do Cerrado.

Microrganismos	Média (UFC/mL)	Mediana (UFC/mL)	CV (%)
<i>Staphylococcus</i> spp.	< 3,25 x 10 ⁴ est.*	< 1,00 x 10 ⁴ est.	246,9
<i>Staphylococcus</i> coagulase positivo	< 3,07 x 10 ⁴ est.	< 1,00 x 10 ⁴ est.	262,6
<i>Staphylococcus</i> coagulase negativo	< 6,49 x 10 ³ est.	< 1,00 x 10 ⁴ est.	103,5
Bolores e leveduras	< 4,06 x 10 ² est.	< 1,00 x 10 ¹ est.	112,4

Est.: valor estimado.

Fonte: Próprio autor.

De modo geral, os valores encontrados para *Staphylococcus* spp., *Staphylococcus* coagulase positivo e *Staphylococcus* coagulase negativo encontrados tendem a variar entre as regiões produtoras de QMA (OLIVEIRA, 2014; SALES, 2015; FIGUEIREDO, 2018).

Na microrregião de Araxá, Sales (2015) investigou a presença de *Staphylococcus* spp., SCP e SCN em amostras de leite cru utilizadas na fabricação de QMA apenas no período da seca. Foram descritos valores médios da ordem de 10⁵ UFC/mL para *Staphylococcus* spp. e SCP, que são superiores aos encontrados no presente trabalho. Nas contagens de SCN, foi observado resultado semelhante à microrregião do Cerrado no período chuvoso, com valor na ordem de 10³ UFC/mL.

Na microrregião da Serra do Salitre, Figueiredo (2018) encontrou, na época das chuvas, em amostras de leite cru utilizados na fabricação de QMA uma média de 1,38 x 10⁵ UFC/mL para *Staphylococcus* spp., considerada uma contagem elevada e que pode contribuir para a contaminação do leite por toxinas estafilocócicas. Para o grupo dos SCP os valores medianos descritos foram de 8,32 x 10³ UFC/mL, inferior, porém, próximo ao encontrado na microrregião do Cerrado.

Diferentemente, Oliveira (2014) investigou a presença apenas de SCP em amostras de leite cru utilizado na produção de QMA da microrregião de Campo das Vertentes e não identificou a presença desse grupo de microrganismos em nenhum dos períodos estudados.

A metodologia aplicada neste trabalho permite a detecção e contagem apenas de *Staphylococcus* coagulase positivo, entretanto o Decreto nº 42.645 de 2002, propõe a

enumeração de *S. aureus* em um limite de 10^2 UFC/mL (2,00 Log UFC/mL) para o leite cru utilizado na fabricação do QMA (MINAS GERAIS, 2002; MINAS GERAIS, 2018). Embora já revogado, a atual legislação vigente não dispõe de padrões para o leite cru. Sendo assim, os resultados não permitem uma conclusão dentro dos parâmetros legais. Ainda assim, considerando que o gênero *Staphylococcus* e o agrupamento em coagulase positivo inclui, mais comumente, a espécie *S. aureus*, a presença em contagens maiores que 10^2 destes microrganismos pode indicar uma higiene deficiente de manipuladores e do material de ordenha. Ainda remete à possibilidade de que o rebanho das propriedades analisadas seja portador de microrganismos causadores de mastite, enfermidade diretamente relacionada a contaminação de leite cru e presença de *Staphylococcus aureus* (SALES, 2015; FAGUNDES e OLIVEIRA, 2004).

Alguns trabalhos que realizaram análises microbiológicas para contagem de *S. aureus* no leite cru utilizado para a produção do QMA da microrregião do Serro, encontraram valores acima do permitido pela legislação. Pinto (2004) encontrou contagens entre 4,28 a 7,60 Log UFC/mL, Martins (2006) observou valores de 4,43 no período de seca e 3,45 no período chuvoso, ambos também acima do permitido. Por fim, Santos (2010) demonstra resultados entre 2,94 e 3,71 durante diferentes estações do ano.

Para bolores e leveduras, as contagens encontradas foram consideravelmente baixas. A média e a mediana foram estimadas em menor do que $4,06 \times 10^2$ e $1,00 \times 10^1$ UFC/mL, respectivamente. Contaminações por bolores e leveduras acontecem em diversas etapas da fabricação do QMA, que vão desde a matéria prima até o produto final (SANTOS, 2013). No caso do leite cru, bolores e principalmente leveduras apresentam um crescimento relativamente baixo, uma vez que seu crescimento é inibido por bactérias (MENEZES et al., 2014). Além disso, o pH do leite é próximo à neutralidade (SALES, 2015), enquanto muitas das espécies de bolores e leveduras encontradas no leite e derivados lácteos tem pH ótimo de crescimento mais ácido (MENEZES et al., 2014). Esses fatores, contribuem para que apesar de presente no leite, este não seja a principal fonte de bolores e leveduras para o QMA.

Oliveira (2014) ao analisar bolores e leveduras em leite cru de queijarias da microrregião de Campo das Vertentes, indicou ausência destes microrganismos, o que confirma que a presença destes no leite cru é restrita, e quando presente está em baixa contagem, assim como os resultados obtidos no presente trabalho.

4.2 Contagem de microrganismos no pingo

Na Tabela 2 são apresentadas as médias, as medianas e os CVs das contagens de microrganismos presentes nas amostras de soro-fermento, mais comumente denominado “pingo”, utilizado na fabricação do QMA da microrregião do Cerrado.

Tabela 2. Média, mediana e coeficiente de variação (CV) de *Staphylococcus* spp., *Staphylococcus* coagulase positivo, *Staphylococcus* coagulase negativo, bolores e leveduras observados em amostras de soro-fermento utilizado na fabricação de Queijo Minas Artesanal do Cerrado.

Microrganismos	Média (UFC/mL)	Mediana (UFC/mL)	CV (%)
<i>Staphylococcus</i> spp.	< 1,32 x 10 ⁶ est.*	< 2,93 x 10 ⁴ est.	156,0
<i>Staphylococcus</i> coagulase positivo	< 8,16 x 10 ⁵ est.	< 2,43 x 10 ⁴ est.	207,1
<i>Staphylococcus</i> coagulase negativo	< 5,33 x 10 ⁵ est.	< 1,00 x 10 ⁴ est.	280,3
Bolores e leveduras	< 8,74 x 10 ³ est.	< 8,80 x 10 ⁴ est.	300,9

Est.: valor estimado.

Fonte: Próprio autor.

Todos os microrganismos no gênero *Staphylococcus* apresentaram contagens medianas semelhantes, na ordem de 10⁴ UFC/mL. O maior valor médio foi observado nas contagens de *Staphylococcus* spp., estimado em 1,32x10⁶ UFC/mL. As médias para SCP e SCN foram semelhantes, 8,16 x 10⁵ UFC/mL e 5,33 x 10⁵ UFC/mL, respectivamente. As altas contagens de *Staphylococcus* spp., *Staphylococcus* coagulase positivo e *Staphylococcus* coagulase negativo no pingo demonstram que esse gênero de microrganismos é adaptado a este microbioma.

Apesar da legislação para QMA não determinar nenhum parâmetro microbiológico para o soro-fermento, assim como são indicados parâmetros para o queijo, este tem grande importância na qualidade microbiológica do queijo, uma vez que o pingo coletado de um lote de queijos será utilizado no dia seguinte na produção do próximo lote. Dessa maneira, o pingo pode comprometer a qualidade de uma grande produção de queijos, em caso de contaminação com microrganismos patogênicos ou deteriorantes (REZENDE, 2014; SALES, 2015).

O pingo geralmente é coletado após a adição de sal nos queijos e é armazenado em temperatura ambiente até o dia seguinte no momento da próxima produção. O sal associado à temperatura da microrregião seleciona microrganismos mais resistentes e tolerantes aos seus valores de pH e acidez (RAFAEL, 2017), assim como as bactérias do gênero *Staphylococcus* que toleram também altas concentrações de sal (HENNEKINNE et al., 2012).

Em trabalho semelhante, Figueiredo (2018) encontrou, também no período de chuvas, contagens médias de mesma ordem para *Staphylococcus* coagulase positivo, $1,11 \times 10^5$ UFC/mL. Já para *Staphylococcus* spp. seus resultados se mostraram inferiores, com média de $2,29 \times 10^5$ UFC/mL. Sales (2015) apresentou valores de mediana similares para *Staphylococcus* spp. e *Staphylococcus* coagulase negativo, $8,5 \times 10^4$ UFC/mL para ambos, mas para *Staphylococcus* coagulase positivo, a mediana foi inferior, com resultado estimado em $<1,0 \times 10^2$ UFC/mL.

O pingó é uma das principais fontes de bolores e leveduras para o QMA, e apresentou valores mais elevados quando comparado ao leite cru utilizado como matéria prima dos queijos, com contagem média estimada de $8,74 \times 10^3$ UFC/mL e mediana de $8,80 \times 10^4$. Oliveira (2014) ao analisar o pingó proveniente de queijarias da microrregião de Campo das Vertentes, no período das chuvas, encontrou contagens médias mais elevadas de bolores e leveduras, com $1,1 \times 10^6$ UFC/mL, além de não ter encontrado diferenças significativas entre o período de seca e chuva (OLIVEIRA, 2014).

Os fungos são microrganismos de significativa importância na produção de queijos, uma vez que podem comprometer a qualidade do queijo ou melhorar suas características através da produção de substâncias aromáticas, contribuindo com sua textura e sabor (SALES, 2015). Porém, podem ser também indesejáveis, os casos de contaminação do pingó podem estar relacionados com a má higienização do ambiente de produção do queijo, considerando que a contaminação e disseminação de bolores e leveduras tem como principal meio o ar (SOARES, 2014).

4.3 Contagem de microrganismos no Queijo Minas Artesanal do Cerrado

4.3.1 *Staphylococcus* spp.

Na Tabela 3 são apresentadas as médias, as medianas e os CVs das contagens de *Staphylococcus* spp. presentes nas amostras de QMA da microrregião do Cerrado em diferentes dias de maturação. Pode-se observar que os valores de média e mediana da contagem de *Staphylococcus* spp. apresentam pequena tendência de aumento ao longo dos 22 dias de maturação. O queijo recém produzido apresenta contagem média estimada de $1,39 \times 10^6$ UFC/g, e aos 10 dias de maturação as contagens são elevadas até $4,01 \times 10^7$ UFC/g. As médias dos 14

e 22 dias de maturação se mantém na ordem de 10^6 UFC/g. Apesar da variação, as medianas não apresentam diferença estatística do 10º dia de maturação até o último analisado.

Tabela 3. Média, mediana e coeficiente de variação (CV) de *Staphylococcus* spp. observados em amostras de Queijo Minas Artesanal do Cerrado em diferentes dias de maturação.

Dias de Maturação	Média (UFC/g)	Mediana (UFC/g)	CV (%)
1	< 1,39 x 10 ⁶ est. ^A	< 1,06 x 10 ⁵ est. ^A	219,70
7	6,06 x 10 ^{6A}	5,00 x 10 ^{6AB}	118,2
10	4,01 x 10 ^{7A}	1,03 x 10 ^{7B}	172,8
14	8,38 x 10 ^{6A}	4,40 x 10 ^{6B}	95,24
22	2,06 x 10 ^{6A}	8,13x 10 ^{5B}	135,9

Est.: valor estimado.

**Médias seguidas por letras distintas, maiúsculas na coluna, diferem entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$);

***Medianas seguidas por letras distintas, maiúsculas na coluna, diferem entre si pelo teste de Kruskal-wallis ($p < 0,05$).

Fonte: Próprio autor.

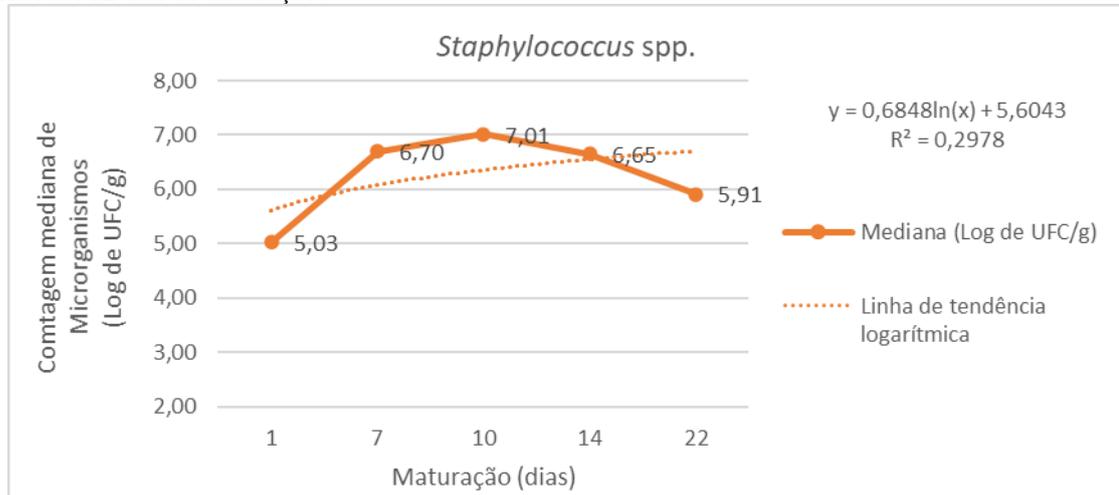
Figueiredo (2018) apresentou resultados na ordem de 10^6 UFC/g para *Staphylococcus* spp. até 63 dias de maturação, não apresentando redução nas contagens. Sales (2015) também apresenta resultado similar ao final dos 57 dias de maturação analisados. Resende (2010) chegou a encontrar 10^8 UFC/g em queijos da Serra da Canastra, o que compactua com a premissa de que este grupo de microrganismo está presente em altas contagens no QMA em diferentes períodos de maturação.

A evolução das contagens de *Staphylococcus* spp. durante os 22 dias de maturação do QMA da microrregião do Cerrado está apresentada na Figura 1. A legislação do QMA não possui parâmetros que limitam a contagem de *Staphylococcus* spp., entretanto, em vista da importância microbiológica desse microrganismo em alimentos é indispensável que se conheça a evolução da sua presença durante a produção e a maturação (SALES, 2015). Além disso, estudos já descreveram que microrganismos desse gênero, mesmo que não sejam coagulase positivo, podem produzir toxinas, colocando em risco a saúde do consumidor (FIGUEIREDO, 2018).

É possível, que a ação de bactérias ácido-láticas com a produção de ácido lático, a competição entre os microrganismos, as mudanças de pH, a redução da umidade, a salga dos queijos, e entre outros fatores comumente utilizados para controle da proliferação de microrganismos indesejáveis, não tenham sido suficientes para diminuir a contagem de *Staphylococcus* spp. (SALES, 2015). Além disso, a constante manipulação na viragem dos queijos durante a maturação pode contribuir para a manutenção da alta contagem, por isso se

faz necessário a aplicação de medidas higiênico-sanitárias e boas práticas de fabricação (SANTOS, 2013).

Figura 1. Evolução da contagem mediana de *Staphylococcus* spp. (Log de UFC/g) em Queijo Minas Artesanal do Cerrado até 22 dias de maturação.



Fonte: Próprio autor.

4.3.2 *Staphylococcus* coagulase positivo

Na Tabela 4 são apresentadas as médias e as medianas das contagens de *Staphylococcus* coagulase positivo presentes nas amostras de QMA da microrregião do Cerrado em diferentes dias de maturação. Os resultados observados para as contagens de SCP apresentam diferenças ($p < 0,05$) e tendência de redução ao longo dos 22 dias de maturação. As médias estimadas são de $4,95 \times 10^5$ UFC/g no queijo recém produzido, e posteriormente reduzem do dia 14º ao 22º de maturação, com contagem na ordem de 10^4 UFC/g. Estatisticamente, os valores medianos demonstram que o queijo recém produzido se mantém semelhante até o 10º dia e se diferem a partir do 14º dia, permanecendo assim até o último dia de maturação analisado.

Resultados semelhantes, com valores de SCP maiores nos queijos recém produzidos também foram encontrados em estudos referentes à outras regiões produtoras de QMA (Sales, 2015; Figueiredo, 2018;). Sales (2015), analisando o QMA da microrregião de Araxá, apresentou contagem mediana de $8,0 \times 10^4$ UFC/g em queijos frescos e posterior redução após os 7 primeiros dias de maturação. Na microrregião de Serra do Salitre, Figueiredo (2018) encontrou inicialmente mediana de $7,78 \times 10^3$ UFC/g para queijos recém produzidos e manteve a mediana de $0,9 \times 10^1$ UFC/g do 7º até o 63º dia de maturação. A evolução das contagens de

Staphylococcus coagulase positivo durante os 22 dias de maturação do QMA da microrregião do Cerrado está apresentada na Figura 2.

Tabela 4. Média, mediana e coeficiente de variação (CV) de *Staphylococcus* coagulase positivo observados em amostras de Queijo Minas Artesanal do Cerrado em diferentes dias de maturação.

Dias de Maturação*	Média (UFC/g)	Mediana (UFC/g)	CV (%)
1	< 4,95 x 10 ⁵ est. ^A	< 2,43 x 10 ⁴ est. ^A	274,0
7	< 3,09 x 10 ⁶ est. ^A	< 1,00 x 10 ³ est. ^A	196,7
10	< 5,94 x 10 ⁶ est. ^A	< 1,00 x 10 ³ est. ^A	194,2
14	< 1,60 x 10 ⁴ est. ^A	< 1,00 x 10 ³ est. ^B	310,9
22	< 8,27 x 10 ⁴ est. ^A	< 1,00 x 10 ³ est. ^B	327,7

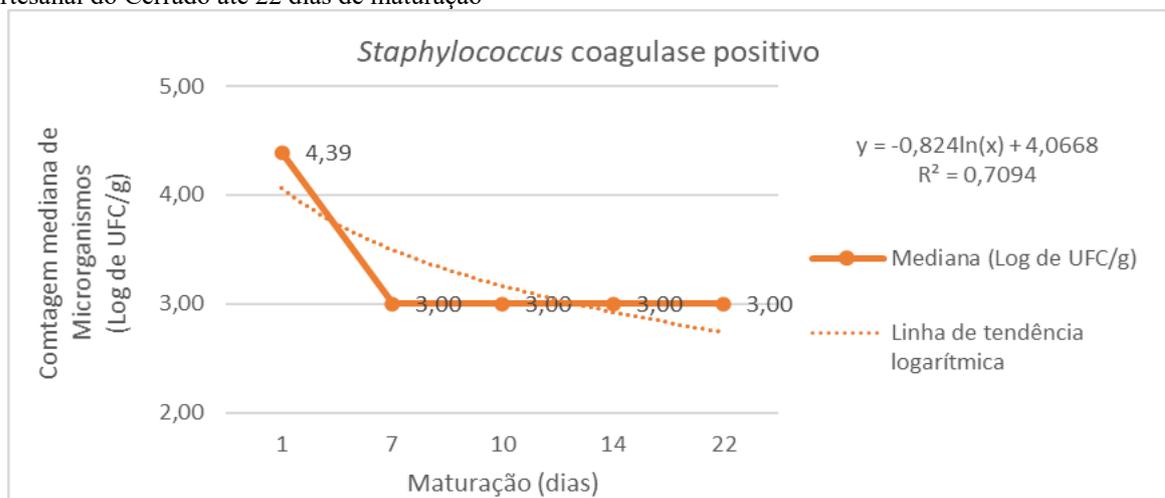
Est.: valor estimado.

*Limite permitido pela legislação de 10³ UFC/g para *Staphylococcus* coagulase positivo, conforme Portaria IMA nº 1837, de 5 julho de 2018;

**Médias seguidas por letras distintas, maiúsculas na coluna, diferem entre si pelo teste de Tukey (p<0,05);

***Medianas seguidas por letras distintas, maiúsculas na coluna, diferem entre si pelo teste de Kruskal-wallis (p<0,05);

Figura 2. Evolução da contagem mediana de *Staphylococcus* coagulase positivo (Log de UFC/g) em Queijo Minas Artesanal do Cerrado até 22 dias de maturação



Com base nas contagens de SCP encontradas no leite cru e no soro-fermentado utilizados como matéria prima dos queijos, possivelmente estes são as prováveis fontes de contaminação. Entretanto, o excesso de manipulação e a má higienização dos manipuladores, utensílios e ambiente durante a fabricação do QMA também podem contribuir para as altas contagens deste microrganismo (SALES, 2015).

Em relação ao enquadramento legal, a Portaria IMA Nº 1837, de 5 de julho de 2018 estabelecem a contagem de 1x10³ UFC/g (3,00 Log UFC/g) como limite permitido para presença de *Staphylococcus* coagulase positivo em QMA. Com base nas análises estatísticas

empregadas nos valores medianos, nos três primeiros dias de maturação analisados (dias 1, 7 e 10), os queijos não atendem ao requisito, e apenas a partir do 14º dia de maturação os queijos alcançam este parâmetro. De maneira similar, Sales (2015) apontou que com 14 dias o QMA produzido na microrregião de Araxá, tanto no período das chuvas, quanto no período da seca, atingiu o limite exigido pela legislação. Figueiredo (2018) também mostra que após o 14º dia de maturação não foi possível detectar bactérias capazes de coagular o plasma no QMA da Serra do Salitre.

No entanto, Dorés (2007) indicou que apenas no 22º dia de maturação do QMA da microrregião da Canastra atingiu o limite permitido para presença de *Staphylococcus* coagulase positivo. Já Oliveira (2014) não encontrou diminuição significativa nas contagens de *Staphylococcus* coagulase positivo durante 60 dias de maturação para QMA produzido em propriedades de Campos das Vertentes.

A maturação do QMA se mostrou eficaz na redução das contagens de *Staphylococcus* coagulase positivo, possibilitando atingir o limite previsto pela legislação com 14 dias de maturação (MINAS GERAIS, 2002a). Todavia, não se pode desconsiderar que a melhor opção para controlar e reduzir o número de SCP e evitar a produção de toxinas é a prevenção da contaminação do QMA por estes microrganismos, com manutenção de boas práticas na obtenção das matérias primas e higiene adequada de manipuladores e do local de preparação e armazenamento do queijo.

4.3.3 *Staphylococcus* coagulase negativo

Na Tabela 5 são apresentadas as médias, as medianas e os CVs das contagens de *Staphylococcus* coagulase negativo presentes nas amostras de QMA da microrregião do Cerrado em diferentes dias de maturação. As contagens médias para SCN em queijos recém produzidos são estimadas em $9,05 \times 10^5$ UFC/g, ao 10º de maturação atinge valores na ordem de 10^7 UFC/g, e ao final dos 22 dias de maturação os valores são de $1,98 \times 10^6$ UFC/g.

Estatisticamente, considerando os valores medianos para contagem de SCN, queijos recém produzidos e com 7 dias de maturação se assemelham com queijos maturados por 14 e 22 dias ($p > 0,05$). Apenas queijos com 10 dias de maturação se diferenciaram dos demais. De modo geral, os valores de contagem de *Staphylococcus* coagulase negativo apresentam uma tendência a aumentar ao longo dos 22 dias de maturação analisados.

Tabela 5. Média, mediana e coeficiente de variação (CV) de *Staphylococcus* coagulase negativo observados em amostras de Queijo Minas Artesanal do Cerrado em diferentes dias de maturação.

Dias de Maturação	Média (UFC/g)	Mediana (UFC/g)	CV (%)
1	< 9,05 x 10 ⁵ est. ^A	<1,00 x 10 ⁴ est. ^A	321,1
7	< 2,97 x 10 ⁶ est. ^A	< 2,43 x 10 ⁵ est. ^A	197,8
10	< 3,42 x 10 ⁷ est. ^A	< 2,13 x 10 ⁶ est. ^B	209,3
14	8,37 x 10 ^{6A}	4,46 x 10 ⁶ A	95,56
22	1,98 x 10 ^{6A}	6,03 x 10 ⁵ A	144,0

Est.: valor estimado.

**Médias seguidas por letras distintas, maiúsculas na coluna, diferem entre si pelo teste de Tukey (p<0,05);

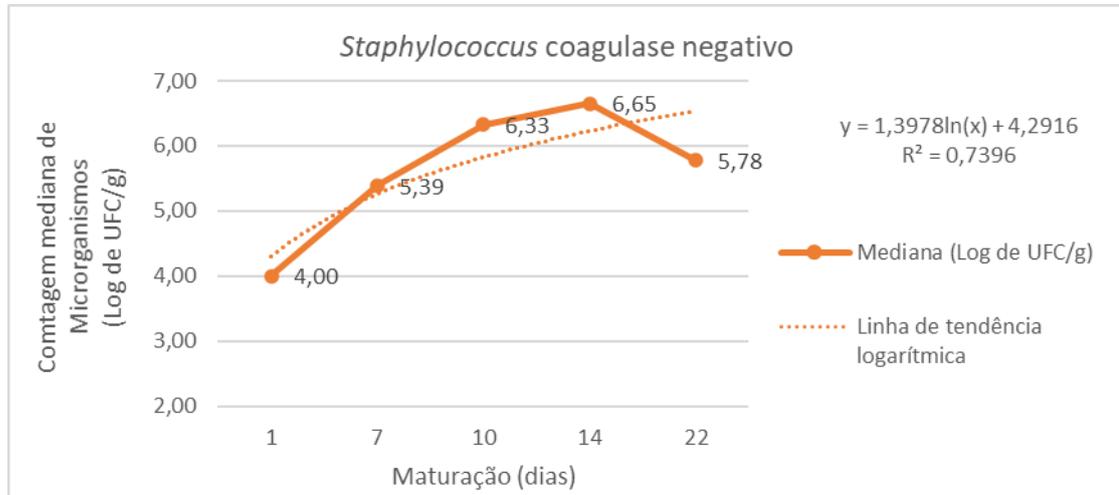
***Medianas seguidas por letras distintas, maiúsculas na coluna, diferem entre si pelo teste de Kruskal-wallis (p<0,05);

Resende (2014) ao analisar queijos de quatro produtores da microrregião de Campo das Vertentes com 0 e 30 dias de maturação observou a tendência das contagens de *Staphylococcus* coagulase negativo se manter constante, não sendo observada diferença significativa para nenhuma das amostras. Sales (2015) também relata que os valores médios entre o 1º e o 57º dia de maturação não apresentaram diferença significativa.

Os queijos são virados todos os dias durante a maturação (SANTOS, 2013). A constante manipulação sem cuidados higiênicos necessários, possivelmente, contribui para a manutenção de altas contagens destes microrganismos no queijo, e pode justificar os resultados encontrados no presente trabalho. Visto que a maturação não é eficiente para a redução de SCN no queijo artesanal, medidas sanitárias e maior higiene ao manipular o queijo durante sua elaboração e maturação podem diminuir a presença desse microrganismo no QMA. A evolução das contagens de SCN durante os 22 dias de maturação do QMA da microrregião do Cerrado está apresentada na Figura 3.

Não existem padrões legais que abrangem a contagem de *Staphylococcus* coagulase negativo (MINAS GERAIS, 2002). Este fato pode ser considerado uma falha para os padrões do QMA, uma vez que estes microrganismos já foram relacionados com a produção de enterotoxinas (CARMO et al., 2002) em condições ideais de atividade de água e pH, ainda que em menor quantidade em comparação com espécies coagulase positivo (PEREIRA et al., 2001).

Figura 3. Evolução da contagem mediana de *Staphylococcus* coagulase positivo (Log de UFC/g) em Queijo Minas Artesanal do Cerrado até 22 dias de maturação.



4.3.4 Bolores e leveduras

Na Tabela 6 são apresentadas as médias, as medianas e os CVs das contagens de bolores e leveduras presentes nas amostras de QMA da microrregião do Cerrado em diferentes dias de maturação. Estatisticamente, partir do 7º dia de maturação os queijos apresentam quantidades de microrganismos semelhantes até o 22º dia de maturação ($p > 0,05$), embora sejam diferentes em relação ao queijo fresco. Os valores medianos na contagem de bolores e leveduras inicialmente é menor, estimado em $1,00 \times 10^3$ UFC/g e tem aumento considerável a partir do 7º dia de maturação, mantendo-se constante na ordem de 10^5 UFC/g até os 22 dias.

Tabela 6. Média, mediana e coeficiente de variação (CV) de bolores e leveduras observados em amostras de Queijo Minas Artesanal do Cerrado em diferentes dias de maturação.

Dias de Maturação	Média (UFC/g)	Mediana (UFC/g)	CV (%)
1	$< 6,74 \times 10^3$ est. ^A	$< 1,00 \times 10^3$ est. ^A	159,7
7	$2,76 \times 10^6$ ^A	$2,46 \times 10^6$ ^B	252,2
10	$1,39 \times 10^6$ ^A	$9,66 \times 10^5$ ^B	90,96
14	$4,47 \times 10^6$ ^A	$6,40 \times 10^5$ ^B	152,9
22	$4,25 \times 10^6$ ^A	$5,93 \times 10^5$ ^B	179,2

Est.: valor estimado.

**Médias seguidas por letras distintas, maiúsculas na coluna, diferem entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$);

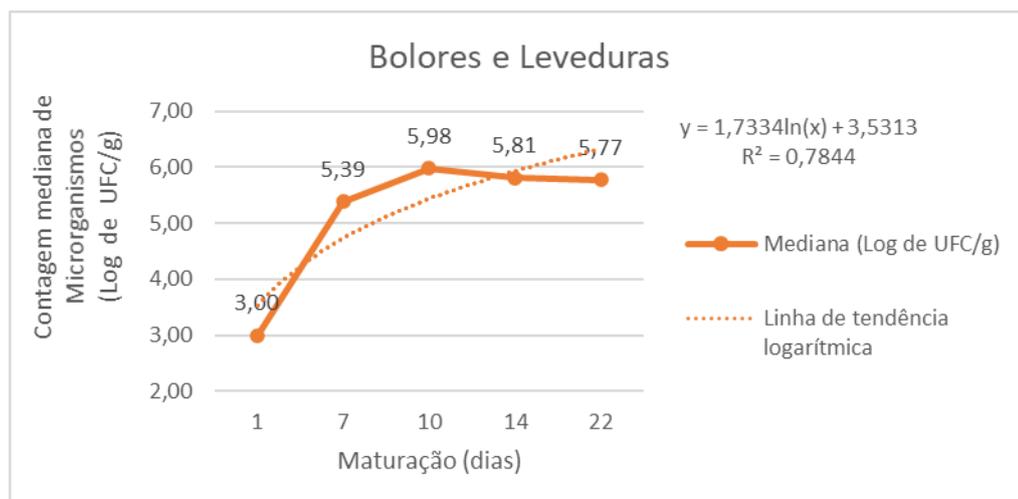
***Medianas seguidas por letras distintas, maiúsculas na coluna, diferem entre si pelo teste de Kruskal-wallis ($p < 0,05$);

Como esperado, as contagens de bolores e leveduras no QMA não sofrem efeito de redução através da maturação. Os valores médios passam de estimados $6,74 \times 10^3$ UFC/g no primeiro dia para $2,76 \times 10^6$ UFC/g no sétimo dia de maturação, por fim as médias permanecem na ordem de 10^6 UFC/g até o último dia de maturação analisado

Do mesmo modo, Sales (2015), em queijos artesanais de Araxá, observou que na época das chuvas os queijos com 7 e 14 dias apresentaram as maiores médias, e a partir do 22º dia até o 57º os resultados foram similares. Figueiredo (2018) observou elevadas contagens até o 28º dia de maturação, quando iniciou redução das contagens para queijos da Serra do Salitre. De modo geral, a contagem média de bolores e leveduras é inicialmente a menor, aumenta no meio da maturação, e por fim diminui até concentrações de 10^5 . Diferentemente, Oliveira (2014) não encontrou diferença ($p > 0,05$) entre as médias das contagens de bolores e leveduras durante todo o período de maturação, mas também descreveu valores que variam de $1,2 \times 10^4$ a $4,7 \times 10^6$.

Em um maior tempo de maturação ocorre a redução de pH e umidade (FIGUEIREDO, 2018), condições geralmente favoráveis ao maior crescimento de bolores e leveduras (OLIVEIRA, 2014), gerando uma linha de tendência crescente, assim como observada no presente trabalho. A evolução das contagens de bolores e leveduras durante os 22 dias de maturação do QMA da microrregião do Cerrado está apresentada na Figura 4.

Figura 4. Evolução da contagem mediana de bolores e leveduras (Log de UFC/g) em Queijo Minas Artesanal do Cerrado até 22 dias de maturação.



A maturação voltada à proliferação fúngica em diversos tipos de queijos é comum, e remete à importância de bolores e leveduras nas características sensoriais do QMA (FIGUEIREDO, 2018). Em contraste com as bactérias ácido-láticas, de importância

reconhecida no início do processo de fabricação do QMA, os bolores e as leveduras são considerados microrganismos secundários, essenciais na maturação (OLIVEIRA, 2014). A permanência de altas contagens destes microrganismos durante toda a maturação, sugere o seu grande impacto na aparência, no sabor marcante e na textura final do QMA (SANTOS, 2013).

A legislação do QMA também não regulamenta um limite permitido para contagem de bolores e leveduras, e apesar de contribuir positivamente para o queijo, de maneira oposta, bolores e leveduras podem desencadear alterações indesejáveis e produção de micotoxinas que colocam a saúde do consumidor em risco (SALES, 2015). Além de comprometer a qualidade higiênico-sanitária do produto e o interesse do consumidor pelo produto, sugere falhas higiênicas de manipuladores, do ambiente de maturação e dos equipamentos utilizados na produção (SANTOS, 2013).

As espécies de bolores e leveduras variam de acordo com o tipo e a microrregião de produção (OLIVEIRA, 2014), mas a identificação e determinação de gêneros e espécies de fungos presentes em QMA, e as consequências relacionadas à presença destes microrganismos ainda é pouco estudada (FIGUEIREDO, 2018).

5 CONCLUSÃO

Os resultados indicam que a qualidade microbiológica do QMA do Cerrado foi influenciada pelas condições do soro-fermento, do leite cru, e pelo tempo de maturação. As amostras de QMA analisadas apresentaram contagens relevantes de *Staphylococcus* spp., *Staphylococcus* coagulase positivo, *Staphylococcus* coagulase negativo e bolores e leveduras.

A maturação dos queijos Minas artesanal da microrregião do Cerrado resultou na redução das contagens medianas de *Staphylococcus* coagulase positivo, permitindo atingir o limite previsto pela legislação com 14 dias de maturação. *Staphylococcus* spp. e *Staphylococcus* coagulase negativo foram os microrganismos com maior resistência à redução, mantendo valores similares, com altas contagens do primeiro ao último dia de maturação analisados, demonstrando uma tendência a permanecer elevadas.

Bolores e leveduras também demonstraram resistência a diminuir contagens. Apesar do queijo fresco conter baixas contagens deste microrganismo, foi observado o rápido aumento das contagens a partir do 7º dia de maturação, permanecendo sem redução até o último dia analisado.

A permanência de altas contagens de *Staphylococcus* spp. e *Staphylococcus* coagulase negativo e bolores e leveduras durante quase todo o período de maturação analisado demonstra a necessidade de mais estudos afim de se verificar a possibilidade de se também estabelecer limites máximos para estes microrganismos em queijos.

Ainda que muito importante na manutenção da qualidade microbiológica do QMA, a maturação não deve ser a única ferramenta utilizada, devendo ser associada à utilização de boas matérias primas, controle sanitário do rebanho, boas práticas de produção, higiene de utensílios e local de produção, e armazenamento do queijo durante a maturação, para então oferecer ao consumidor um alimento seguro.

REFERÊNCIAS

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. Portaria nº 146 de 07 de março de 1996. Regulamento técnico de identidade e qualidade de produtos lácteos. Brasília, 1996.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. Resolução nº 7 de 28 de novembro de 2000. Critérios de funcionamento e de controle da produção de queijarias. Brasília, 2000.

BRASIL. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. Instrução Normativa nº 62, de 26 de agosto de 2003. Métodos Analíticos Oficiais Microbiológicos para Análises Microbiológicas para Controle de Produtos de origem Animal e Água. Diário Oficial da União Federativa do Brasil, 18 de setembro de 2003.

BRASIL. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. Instrução Normativa nº 57, de 15 de dezembro de 2011. Dispõe sobre o período de maturação dos queijos artesanais tradicionalmente elaborados a partir de leite cru. Diário Oficial da União Federativa do Brasil, Brasília, 2011.

CARMO, L. S.; DIAS, R. S.; LINARDI, V. R.; et al. Food poisoning due to enterotoxigenic strains of *Staphylococcus* presente in Minas cheese and raw milk in Brazil. **Food Microbiology**, v. 19, n. 1, p. 9-14, 2002.

CASTILHO, I. G. Capacidade de adesão, invasão e produção de biofilme em superfície biótica e abiótica por *Staphylococcus aureus* isolados de leite de vacas com mastite subclínica. 2016. 77 p. (Doutorado em Biologia Geral e Aplicada) – Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2016.

DORES, M. T. Queijo Minas Artesanal da Canastra maturado à temperatura ambiente e sob refrigeração. 2007. 103 p. (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2007.

EMBRAPA. Queijo Minas Artesanal: Valorizando a Agroindústria Familiar. Brasília, DF: Embrapa; Rio de Janeiro: Embrapa Agroindústria de Alimentos, 2018. Disponível em: <https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/199625/1/Livro-Queijo-Minas-Artesanal-Ainfo.pdf>. Acesso em 13 de abril de 2020.

EMPRESA DE ASSISTÊNCIA TÉCNICA E EXTENSÃO RURAL DE MINAS GERAIS (EMATER). Programa do Queijo Minas Artesanal, 2014. Disponível em: <http://www.emater.mg.gov.br>. Acesso em 20 de julho de 2019.

EMPRESA DE ASSISTÊNCIA TÉCNICA E EXTENSÃO RURAL DE MINAS GERAIS (EMATER). Caracterização da microrregião do Alto Paranaíba como produtora do Queijo Minas Artesanal. Patos de Minas, 2003.

FAGUNDES, Helena; OLIVEIRA, Carlos Augusto Fernandes. Infecções intramamárias causadas por *Staphylococcus aureus* e suas implicações em saúde pública. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 34, n. 4, p.1315-1320, ago. 2004.

FEITOSA, Amanda Campos et al. *Staphylococcus aureus* em alimentos. **Revista Desafios**, Palmas, v. 4, n. 4, p.15-31, 03 out. 2017.

FIGUEIREDO, R. C. Perfil socioeconômico de agricultores familiares e caracterização de Queijo Minas Artesanal de Serra Do Salitre (MG) em diferentes períodos de maturação e épocas do ano. 2018. 119 p. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) - Universidade Federal de Minas Gerias, Belo Horizonte, 2018.

HENNEKINNE, Jacques-antoine; BUYSER, Marie-laure de; DRAGACCI, Sylviane. *Staphylococcus aureus* and its food poisoning toxins: characterization and outbreak investigation. **Fems Microbiology Reviews**, [s.l.], v. 36, n. 4, p.815-836, jul. 2012. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1111/j.1574-6976.2011.00311.x>.

IPHAN. Dossiê Interpretativo 11. Modo artesanal de fazer queijo de Minas: Serro, Serra da Canastra e Serra do Salitre (Alto Paranaíba). Instituto do Patrimônio histórico e artístico nacional. – Brasília, DF, 2014.

MARQUES, Marcia Regina Haddad; MARTINS, Rodrigo Prado; NETO Adelino Cunha. Ocorrência de *Staphylococcus coagulase* positiva em leite e queijo: identificação, perfil enzimático e biotipagem. **Higiene Alimentar**, Cuiabá, v. 21, n140, p. 86-94, abr. 2006.

MARTINS, J. M. Características físico-químicas e microbiológicas durante a maturação do Queijo Minas Artesanal da região do Serro. 2006. 158 p. (Doutorado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2006.

MELO, P. C. Estudo epidemiológico, genotípico e fenotípico de stirpes de *Staphylococcus aureus* produtoras de biofilmes isoladas do ambiente de ordenha e de casos de mastite bovina. 2011. 161 p. (Doutorado em Medicina Veterinária) – Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2011.

MENEZES, Maria Fernanda; SIMEONI, Caroline Posser; BORTOLUZZI, Débora; HUERTA, Katira; ETCHEPARE, Mariana; MENEZES, Cristiano. MICROBIOTA E CONSERVAÇÃO DO LEITE. **Revista Eletrônica em Gestão, Educação e Tecnologia Ambiental**, [S.L.], v. 18, 5 jun. 2014. Universidade Federal de Santa Maria. <http://dx.doi.org/10.5902/2236117013033>.

MINAS GERAIS. Assembleia Legislativa do Estado de Minas Gerais. Lei nº 14.185, de 31 de janeiro de 2002. Dispõe sobre o processo de produção de Queijo Minas Artesanal e dá outras providências. Belo Horizonte: Assembleia Legislativa do Estado de Minas Gerais, 2002a.

MINAS GERAIS. Assembleia Legislativa do Estado de Minas Gerais. Decreto nº 42.645, de 5 de junho de 2002. Aprova o regulamento da Lei nº 14.185, de 31 de janeiro de 2002 que dispõe sobre o processo de produção de Queijo Minas Artesanal. Belo Horizonte: Assembleia Legislativa do Estado de Minas Gerais, 2002b.

MINAS GERAIS. Assembleia Legislativa do Estado de Minas Gerais. Portaria nº 874, de 2 de outubro de 2007. Altera a denominação da microrregião do Alto Paranaíba como produtora do Queijo Minas Artesanal. Instituto Mineiro De Agropecuária, Belo Horizonte, 2 de outubro de 2007.

MINAS GERAIS. Assembleia Legislativa do Estado de Minas Gerais. Decreto nº 44.864, de 01 de agosto de 2008. Altera o regulamento de lei nº 14.185 de 31 de janeiro de 2002, que dispõe sobre o processo de produção de Queijo Minas Artesanal. Belo Horizonte: Assembleia Legislativa do Estado de Minas Gerais, 2008.

MINAS GERAIS. Assembleia Legislativa do Estado de Minas Gerais. Lei 20.549, de 18 de dezembro de 2012. Dispõe sobre a produção e a comercialização dos queijos artesanais de Minas Gerais. Belo Horizonte: Assembleia Legislativa do Estado de Minas Gerais, 2012.

MINAS GERAIS. Assembleia Legislativa do Estado de Minas Gerais. Portaria IMA nº 1670, de 29 de outubro de 2016. Dispõe sobre os parâmetros e Padrões físico – químico e microbiológicos de produtos de origem animal e água de abastecimento. Minas Gerais. Belo Horizonte: Assembleia Legislativa do Estado de Minas Gerais, 2016.

MINAS GERAIS. Assembleia Legislativa do Estado de Minas Gerais. Lei nº 23.157, de 18 de dezembro de 2018. Dispõe sobre a produção e a comercialização dos queijos artesanais de Minas Gerais. Belo Horizonte: Assembleia Legislativa do Estado de Minas Gerais, 2018a.

MINAS GERAIS. Assembleia Legislativa do Estado de Minas Gerais. Portaria IMA Nº 1837, de 5 de julho de 2018. Dispõe sobre Padrões e Parâmetros Físico-Químicos e Microbiológicos de Produtos de Origem Animal e da Água de Abastecimento. Belo Horizonte, 5 de junho de 2018b.

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

MINAS GERAIS. Assembleia Legislativa do Estado de Minas Gerais. Portaria IMA Nº 1969 de 26 de março de 2020. Dispõe sobre a produção de Queijo Minas Artesanal - QMA em queijarias e entrepostos localizados dentro de microrregiões definidas e para as demais regiões do Estado, caracterizadas ou não como produtora de Queijo Minas Artesanal - QMA. Minas Gerais. Belo Horizonte: Assembleia Legislativa do Estado de Minas Gerais, 2020b.

OLIVEIRA, L. G. Caracterização microbiológica e físico-química durante a maturação em diferentes épocas do ano de Queijo Minas Artesanal de produtores cadastrados da mesorregião de Campo das Vertentes – MG. 2014. 111p. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) - Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2014.

PEREIRA, M. L.; CARMO, L.S; PEREIRA, J.L. Comportamento de estafilococos coagulase negativos produtores de enterotoxinas em alimentos experimentalmente inoculados. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.21, n.2, p 171-175, 2001.

PINTO, M. S. Diagnóstico socioeconômico, cultural e avaliação dos parâmetros físico-químicos e microbiológicos do Queijo Minas Artesanal do Serro. 2004. Tese de Doutorado - Universidade Federal de Viçosa. 2004

RAFAEL, V.C. Fenótipos da microbiota predominante do fermento endógeno (pingo) relevantes para as características e segurança microbiológica do Queijo Minas Artesanal da Serra da Canastra. 2017. 158 p. Tese de Doutorado - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2017.

RESENDE, M. F. S. Queijo Minas Artesanal da Serra da Canastra: influência da altitude e do nível de cadastramento das queijarias nas características físico-químicas e microbiológicas. 2010. 72p. Dissertação (Mestrado em Ciência animal) - Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2010

SANTOS, K. R. Avaliação da qualidade microbiológica do Queijo Minas Artesanal produzido na serra da canastra – MG. 2013. 59 p. Monografia (Especialização em Microbiologia Ambiental e Industrial) - Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2013.

SANTOS, A. S. Queijo Minas Artesanal da microrregião do Serro – MG: Efeito da sazonalidade sobre a microbiota do leite cru e comportamento microbiológico durante a maturação. 2010. 68 p. Dissertação – Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri, Diamantina, 2010.

SALES, G. A. Caracterização microbiológica e físico-química de Queijo Minas Artesanal da microrregião de Araxá - MG durante a maturação em diferentes épocas do ano. 2015. 107 p. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) - Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2015.

SOARES, D. B. Caracterização físico-química e microbiológica do Queijo Minas Artesanal na região de Uberlândia – MG. 2014. 124 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) – Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2014.

SOBRAL, D. Efeito da nisina na contagem de *Staphylococcus aureus* e nas características do Queijo Minas Artesanal da região de Araxá. 2012. 117 p. Tese de Doutorado - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2012.

VIERA, T. R. Pesquisa de *Staphylococcus* spp. coagulase negativa em queijo colonial inspecionado: identificação, perfil de genes de enterotoxinas clássicas e de resistência à penicilina e à meticilina. 2017. 85 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2017.