

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

LORENA BARBOSA VIEIRA SILVA

**QUANTIFICAÇÃO DE *STAPHYLOCOCCUS* COAGULASE POSITIVO,
STAPHYLOCOCCUS COAGULASE NEGATIVO E PESQUISA DE
SALMONELLA SPP. EM QUEIJO MINAS ARTESANAL PRODUZIDO NO
PERÍODO DA SECA NA MICRORREGIÃO DO TRIÂNGULO MINEIRO.**

PATOS DE MINAS - MG
JANEIRO DE 2023

LORENA BARBOSA VIEIRA SILVA

**QUANTIFICAÇÃO DE *STAPHYLOCOCCUS* COAGULASE POSITIVO,
STAPHYLOCOCCUS COAGULASE NEGATIVO E PESQUISA DE
SALMONELLA SPP. EM QUEIJO MINAS ARTESANAL PRODUZIDO NO
PERÍODO DA SECA NA MICRORREGIÃO DO TRIÂNGULO MINEIRO.**

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 R.O. e Freitas

Coorientadora: Me. Carla Ferreira Lima

**PATOS DE MINAS-MG
JANEIRO DE 2023**

LORENA BARBOSA VIEIRA SILVA

Quantificação de *Staphylococcus* coagulase positivo, *Staphylococcus* coagulase negativo e *Salmonella* spp. em queijo Minas artesanal produzido no período da seca na microrregião do Triângulo Mineiro.

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

Banca examinadora:

Prof. Dr. Guilherme Ramos de Oliveira e Freitas – IBTEC/UFU
Presidente

Prof.(a) Dr.(a) Daiane Silva Resende – IBTEC/UFU
Membro

Prof.(a) Dr.(a) Letícia Rocha Guidi – FEQUI/UFU
Membro

Os membros da Comissão Examinadora acima assinaram a Ata de Defesa que se encontra no Sistema Eletrônico de Informações (SEI) da Universidade Federal de Uberlândia.

Patos de Minas, MG – 17 de janeiro de 2023

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao meu orientador Guilherme que através do seu maravilhoso ensino, me motivou a trilhar um caminho e ter um objetivo na universidade e na carreira profissional.

Agradeço ao meu namorado, e futuro marido, que iluminou minha cabeça sempre mostrando que é possível ter objetivo e lutar pelo que se quer com constância e dedicação

Agradeço a uma pessoa que se tornou especial em vários e vários momentos dentro e fora da Universidade, no qual choramos e rimos, passando por vários perrengues e vitórias juntas, tornando essa caminhada menos solitárias. Foi ali meio perdida no meio de uma pandemia que pude conhecer e ver que é uma pessoa de coração bom, honesta, dedicada, carinhosa, competente, esforçada e muitos mais. Meus agradecimentos vão para você marmotinha 1 (Patrícia).

Agradeço a Carla, pela sua paciência, pelo seu carinho, pela consideração e pela amizade. 2020 foi um ano difícil, mas que me mostrou pessoas maravilhosas estão ali. Sua dedicação e cuidado foram muito importantes nessa jornada, sendo assim, a levo no meu coração sempre.

Agradeço pela minha mãe e pelo meu padrasto, por me incentivar a continuar em todos os momentos de dificuldade

Agradeço minha sogra pelo seu carinho, toda sua consideração e apoio de todas as formas

Agradeço ao meu irmão que tendo suas dificuldades quanto aos seus problemas, sempre me colocou diante das minhas dificuldades e me coloca a refletir em como superar

Agradeço pelos vários familiares, a importância que tiveram pelos meus estudos e comigo nessa caminhada

Agradeço pelas amizades criadas com Gabriel, Gabriela, Lorrane e Yasmin, no qual através deles pude ter meu aconchego. Foi através das dificuldades que nos encontramos e nos abraçamos para passar todas as emoções juntos

Agradeço as pessoas maravilhosas, que tornaram possível a realização deste trabalho com tanta dedicação e esforço. Meus agradecimentos vão para, Istefane e Raoni. São pessoas que levarei comigo no meu coração

Agradeço pela universidade estar aqui e por dar essa oportunidade a nós estudantes de escola pública da cidade a possibilidade de viver uma experiência que trás relevantes agradecimentos. E poder através dos estudos, ter um futuro promissor

*“Até que o sol não brilhe, acenderemos uma vela na
escuridão”.*

(Confúcio)

RESUMO

O queijo Minas artesanal (QMA) é um produto com origem em Minas Gerais tendo seu reconhecimento em todo país. Sua fabricação é feita de maneira empírica e familiar por pequenos e médios produtores em propriedades rurais usando leite cru e a adição culturas *starters* naturais. Alimentos como o QMA dependem de boas práticas de fabricação, uma vez que a manipulação inadequada pode favorecer uma rápida proliferação microbiana. Outros pontos interferentes em uma boa qualidade do produto são o local de produção e maturação e as possíveis falhas nos cuidados com a sanidade dos animais que facilitam a contaminação por microrganismos indesejáveis, e consequentemente, a veiculação de doenças. A legislação do Estado preconiza que, para a comercialização, os QMAs devem preencher requisitos, fazendo-se necessária a maturação por, no mínimo, 22 dias. Sendo assim, esse trabalho teve como objetivo avaliar os parâmetros microbiológicos dos QMAs produzidos na microrregião do Triângulo Mineiro durante o período da seca. Foram selecionadas pela EMATER, amostras coletadas até 22 dias de maturação (0, 10, 14, 17 e 22) para a realização das análises microbiológicas. O resultado do grupo de *Staphylococcus* coagulase positiva apresentou ao final do vigésimo segundo dia uma contagem dentro do padrão da legislação. Para o grupo de *Staphylococcus* coagulase negativa houve um aumento constante nas contagens de microrganismos mesmo com a maturação. A presença de *Salmonella* spp. ocorreu em amostras de um único produtor, sendo detectada a partir do décimo dia de maturação. Com essa pesquisa foi possível verificar insuficiente o processo de maturação para redução ou inibição do crescimento dos microrganismos analisados em todas as amostras. Considerando a aplicação das Boas Práticas Agropecuárias e de Fabricação na cadeia produtiva essenciais, o produtor proporcionará ao mercado um produto com uma boa qualidade.

Palavra-chave: Microrganismos. Legislação. Maturação. Análise microbiológica. Produtores rurais.

ABSTRACT

Minas artisanal cheese (QMA) is a product originating in Minas Gerais and recognized throughout the country. Its manufacture is done in an empirical and familiar way by small and medium-sized farmers produced in rural properties using raw milk and the addition of natural starter cultures. Foods such as QMA depend on good manufacturing practices, since the recommended therapy may favor microbial anticipation. Other interfering points in a good quality of the product are the place of production and behavior and the possible failures in the care with the health of the animals that facilitate the contamination by microorganisms, and, consequently, the transmission of diseases. The State legislation recommends that, for the reduction, the QMAs must fulfill requirements, necessarily making the satisfaction for, at least, 22 days. Therefore, this work aimed to evaluate the microbiological parameters of QMAs produced in the Triangulo Mineiro microregion during the dry season. Samples collected up to 22 days of control (0, 10, 14, 17 and 22) were selected by EMATER for microbiological analysis. The result of the Staphylococcus coagulase positive group presented, at the end of the twenty-second day, a count within the legislation standard. For the coagulase negative Staphylococcus group there was a constant increase in microorganism counts even with the control. The presence of Salmonella spp. occurred in Exclusive of a single producer, being identified from the tenth day of maturity. With this research it was possible to verify the inefficiency of the domain process for the reduction or followed by the growth of the analyzed microorganisms. Considering the application of Good Agricultural and Manufacturing Practices in the essential production chain, the producer will supply his product with a good quality in the market.

Keyword: Microorganisms. Legislation. Maturation. Microbiological analysis. Farmers..

SUMÁRIO

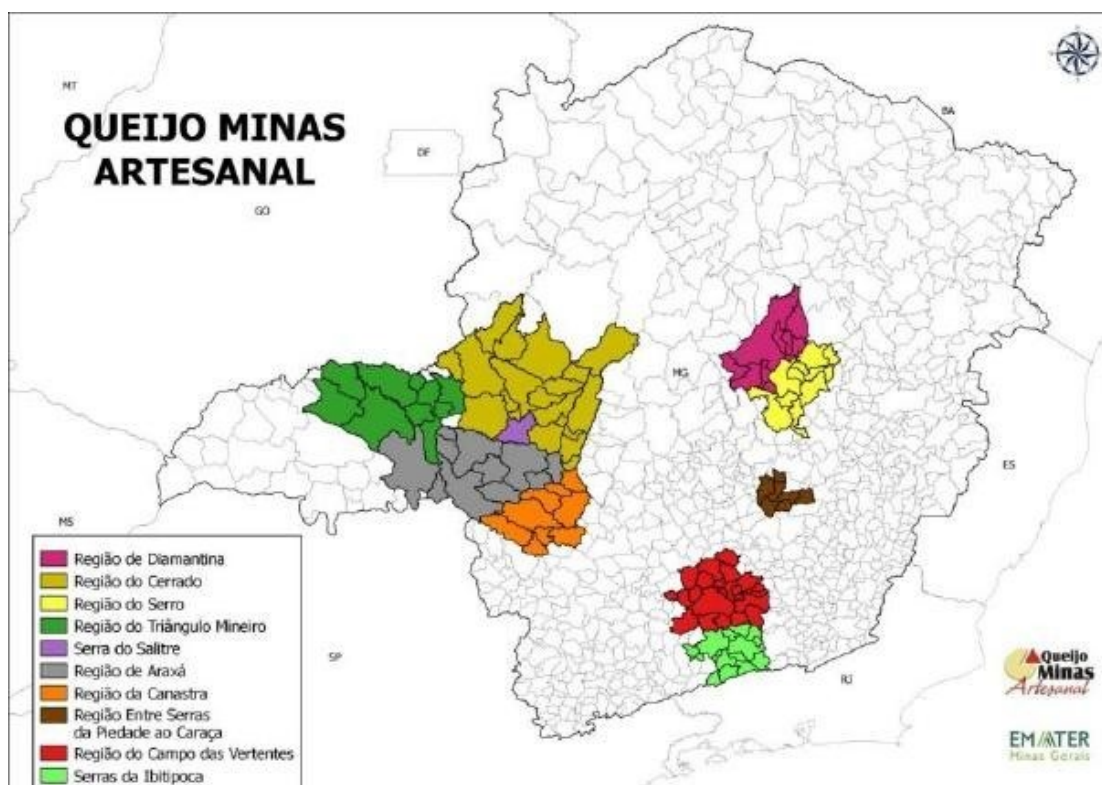
1. INTRODUÇÃO	9
1.1 Queijo Minas artesanal	9
1.2 Queijo Minas artesanal do Triângulo Mineiro.....	11
1.3 Processo de maturação.....	11
1.4 Boas Práticas Agropecuárias e de Produção.....	12
1.5 Legislação.....	14
1.6 Qualidade microbiológica do queijo Minas artesanal.....	15
1.6.1 Microrganismos indesejáveis.....	16
1.6.1.1 <i>Staphylococcus</i>	16
1.6.1.2 <i>Salmonella</i> spp.	17
2. OBJETIVOS.....	18
2.1 Objetivo Geral	18
2.2 Objetivos específicos.....	18
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	18
3.1 Coleta de amostra e local desenvolvimento da pesquisa.....	18
3.2 Preparo de amostra	19
3.3 Contagem de <i>Staphylococcus</i> coagulase positiva e negativa	19
3.4 Avaliação da presença de <i>Salmonella</i> spp.....	20
3.5 Análise Estatística	21
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	21
4.1 Contagem de <i>Staphylococcus</i> coagulase positiva	21
4.2 Contagem de <i>Staphylococcus</i> coagulase negativa	24
4.3 Resultados de <i>Salmonella</i> spp	25
CONCLUSÃO.....	26
REFERÊNCIAS	27

1. INTRODUÇÃO

1.1 Queijo Minas artesanal

Segundo dados históricos, há controvérsias sobre qual período e em qual região começou a produção de queijo artesanal no Brasil, todavia, a provável produção advém de Portugal (ARAÚJO, 2020). O Estado de Minas Gerais tem destaque na produção de queijo, sendo o maior produtor, mais antigo e o primeiro a vigorar a legislação que viabilizou a produção de queijos a partir de leite cru (MINAS GEIRAS, 2002). Atualmente, são reconhecidas dez microrregiões do Estado na produção do QMA: Diamantina, Serro, Canastra, Araxá, Cerrado, Campo das Vertentes, Serra do Salitre, Triângulo Mineiro, Serra da Ibitipoca; e “Entre Serras da Piedade ao Caraça” (Figura 1) (FREITAS, 2022).

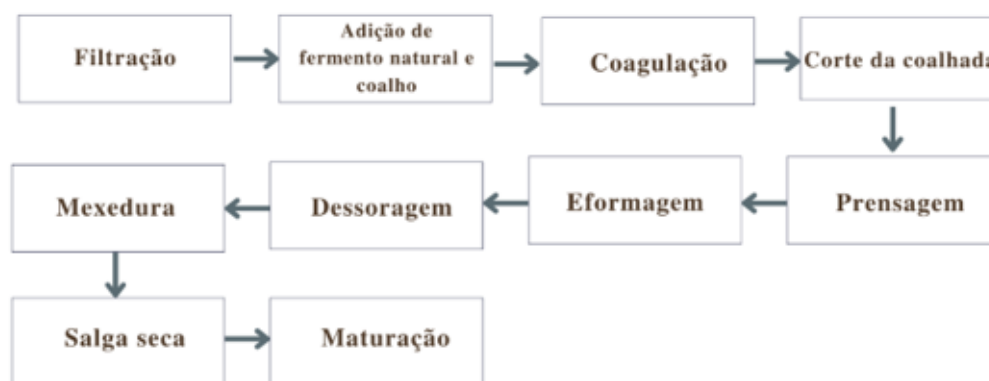
Figura 1 - Microrregiões produtoras de QMA



Fonte: Costa *et al.*, 2022

A portaria do IMA nº 1.969 de 26 de março de 2020 traz a definição do queijo Minas artesanal (QMA) como um queijo elaborado, a partir do leite cru, hígido, integral, de produção própria, com utilização de soro fermento (pingo), e que o produto final apresente consistência firme, core sabor próprios, massa uniforme, isenta de corantes e conservantes, com ou sem olhaduras mecânicas, e que satisfaça os seguintes requisitos: I – processamento com início em até noventa minutos após o começo da ordenha; II – fabricação com leite que não tenha sofrido tratamento térmico; III – utilização dos seguintes ingredientes: culturas lácticas naturais como pingo, soro fermentado ou sorofermento, coalho e sal; IV – maturação, conforme o período estipulado para as microrregiões que possuam pesquisa (IMA, 2020). O modo de preparo do queijo de forma artesanal foi registrado como patrimônio imaterial brasileiro pelo Instituto do Patrimônio Histórico e Artístico Nacional (IPHAN, 2022).

O processo de fabricação do QMA se desenvolve nas seguintes etapas de acordo com a Portaria IMA nº 1.969 de 26 de março de 2020:



Fonte: IMA, 2020

O QMA tem sua peculiaridade em cada região e possui uma grande variedade devido, principalmente, ao pingo, que é o fermento natural e que dá as características do queijo. Os elementos do ambiente interferem de forma direta no pingo, tais como a água, a altitude, a pastagem, o clima, trazendo essa peculiaridade para os queijos na forma de sabor aroma, textura da massa, cor, consistência e componentes nutritivos (MONTEIRO, MATTA; 2018). A produção é uma prática de cunho familiar sendo o modo de sobrevivência de muitas famílias. Os produtores fabricam esses queijos há muitos anos de forma empírica, com respaldo na sua experiência do dia a dia (SOBRAL, 2017).

Sendo um produto feito de forma artesanal e tradicional, o QMA garante sua tradicionalidade através do certificado fornecido pelo Selo Arte. Certificado esse que assegura que o produto alimentício de origem animal foi elaborado de forma artesanal, com receita e processo que apresentem características próprias, tradicionais, regionais ou culturais. Ele pode ser concedido a produtos lácteos, carnes, pescados e seus derivados e produtos de abelhas (NASCIMENTO, 2022). Já o Selo Queijo Artesanal é um certificado que assegura que os queijos artesanais foram elaborados por métodos tradicionais com vinculação e valorização territorial, regional ou cultural (NASCIMENTO, 2022).

1.2 Queijo Minas artesanal do Triângulo Mineiro

O Triângulo Mineiro (TM) é uma microrregião localizada no sudeste do Brasil, composta pelos seguintes municípios: Araguari, Cascalho Rico, Estrela do Sul, Indianópolis, Monte Alegre de Minas, Monte Carmelo, Nova Ponte, Romaria, Tupaciguara e Uberlândia. É uma região reconhecida como produtora de QMA de acordo com os estudos técnicos realizados pela Empresa de Assistência Técnica e Extensão Rural de Estado de Minas Gerais (EMATER-MG) e através da Portaria nº 1397 de 13 de fevereiro de 2014, do Instituto Mineiro Agropecuário (IMA, 2014).

A produção do QMA do TM segue normas estabelecidas que abrangem a fabricação de queijos artesanais a partir de leite cru, beneficiados nas queijarias das propriedades rurais, sem utilização das técnicas industriais (MINAS GERAIS, 2012). O QMA confeccionado conforme a tradição histórica e cultural da região do estado onde for produzido, maturado por um período de 22 dias, apresenta as seguintes características: cor amarelo-ouro, casca semidura e textura compacta. O sabor é pouco pronunciado e suavemente ácido. Seu formato é cilíndrico de 12 a 15 cm, altura de 4 a 6 cm e peso entre 1,0 kg a 1,2 kg (COSTA *et al.*, 2022).

1.3 Processo de maturação

A maturação corresponde a complexas transformações bioquímicas, tanto na parte superficial quanto no interior da massa, sob a ação de enzimas lipolíticas e proteolíticas de origem microbiana (DORES, FERREIRA; 2017). Além da formação de componentes que dão aroma e sabor por diferentes vias, o processo de maturação possui um papel importante para a saúde alimentar, uma vez que há uma redução nas contagens de bactérias indesejáveis e, onsequentemente, uma condição de permanência para as bactérias benéficas. Esse controle bacteriológico é devido à diminuição da atividade de água (A_w) do queijo, que está associada ao aumento da quantidade de sal e à redução de

umidade (SOARES *et al.*, 2018).

Bioquimicamente, a maturação ocorre em decorrência da ação da microbiota, podendo ser dividida em dois grupos: bactérias iniciadoras de ácidos lático (LAB) e os microrganismos que fazem uma reação primária. As LABs são bactérias que transformam ácido lático, peptídeos e ácidos graxos em produtos variados que contribuem para o refinamento do sabor, aroma e características do queijo. Porém, elas também são as principais envolvidas quanto à deterioração do produto por acidificação. A partir dos microrganismos primários, ocorrem os processos de glicólise, que afeta no crescimento dos microrganismos indesejáveis e também colabora com a firmeza do produto. A proteólise ocorre através destes microrganismos, hidrolisando proteínas de alto e baixo peso molecular por meio da quebra enzimática, liberando peptídeos e aminoácidos livres. Esses aminoácidos são catabolizados em uma variedade de compostos sápidos e aromáticos, por exemplo, aminas, ácidos, carbonilas e compostos contendo enxofre. Por fim, o processo de lipólise decorrente destes microrganismos, traz ao queijo a textura e o sabor característico, através da hidrólise enzimática dos triglicerídeos que são convertidos em ácidos graxos, sendo possíveis precursores de compostos de sabor, tais como metil cetonas, álcoois secundários, ésteres, alcanos e lactonas (CORSATO *et al.*, 2021; FERNANDES, 2021; BONFIM, 2019; SANTIAGO-LÓPEZ, 2018; PAULA, 2019; FOX *et al.*, 2017; TEKIN; GÜLER, 2019).

A maturação deve ocorrer em um ambiente no qual o sistema esteja com temperatura e umidade controladas, levando em conta a região de produção. Além disso, deve ter um espaço adequado, higienização e desinfecção periódica de pisos, prateleiras e paredes, sendo o ambiente livre de corrente de ar para que a parte exterior dos queijos não seque de forma desigual da parte interior. Sujidades e colônias fúngicas devem ser sempre removidas com água corrente quando aparentes na parte externa (LIMA, 2021; MONTERO; MATA, 2018).

De acordo com a Portaria IMA nº 1.969 de 26 de março de 2020, o produtor rural se estabelece como fabricante de queijo Minas artesanal quando está apto nas boas práticas de manejo, além da forma de identificação de acordo com o local que foi produzido, tanto para comercialização regional quanto para comercialização.

1.4 Boas Práticas Agropecuárias e de Produção

A qualidade do leite cru para a produção de queijo artesanal está relacionada diretamente com as condições higiênicas que são aplicadas desde o primeiro processo de fabricação, a ordenha

(FOLCHINI, 2018). A composição do leite com alto valor nutritivo (água, gordura, lactose, proteínas e sais minerais), favorece o crescimento tanto de grupos de microrganismos da microbiota natural quanto de microrganismos indesejáveis. Isso demonstra a necessidade de boas práticas na higiene e limpeza durante os processos iniciais, para a redução de infecções mamárias nos animais, e logo, a obtenção de um leite com qualidade microbiológica e físico-química (MENEZES, 2014).

Outros diversos fatores também contribuem para a contaminação do leite como: temperatura de armazenamento, da região, qualidade da água, equipamentos e utensílios utilizados. Para que o produtor mantenha a qualidade, recomenda-se as Boas Práticas Agropecuárias que implementam em todas as etapas de obtenção, produção, processamento, armazenamento, transporte e distribuição de matérias-primas, procedimentos higienicos e de segurança (LINHARES, 2021).

Através do Decreto N° 48.024 de 19 de agosto de 2020, a propriedade onde o leite empregado para a produção de queijos artesanais deve dispor de curral de espera e sala de ordenha, para a realização de análise laboratorial do leite cru, em laboratório da 24 Rede Brasileira de Qualidade do Leite - RBQL, tendo como referência todos os parâmetros estabelecidos na legislação específica. Na propriedade deverá ser realizado teste para detecção de mastite clínica, vacinação contra a febre aftosa e contra a raiva dos herbívoros. Deverá ainda realizar o controle de parasitas e de manifestações patológicas que comprometam a saúde do rebanho ou a qualidade do leite; realizar o controle da administração de medicamentos, respeitando o período de carência, além do controle de insetos, roedores e qualquer outra praga.

A dificuldade de pequenas propriedades em seguirem as exigências impostas pelos órgãos de inspeção, são maiores. No qual, é gerado questionamentos quanto a qualidade na cadeia produtiva. Nesse caso, o ato da limpeza na ordenha e a preocupação com a higiene pessoal, são tão importantes quantos os equipamentos utilizados para garantir essa qualidade (LIMA, 2021).

A ordenha consiste de técnicas fundamentais que consistem na preparação dos tetos das vacas. O *pré-dipping* garante a higienização completa dos tetos antes destes serem ordenhados, através da lavagem com produtos atássépticos, diminuindo ao máximo o número de agentes patogênicos e sujidade que possam estar presentes na pele (NETA, 2018).

O pós-dipping é uma etapa de extrema importância para o controle de novas infecções intramamárias e sujidades. Consiste basicamente na desinfecção dos tetos ao término da ordenha, introduzindo completamente os tetos em uma solução que contém um desinfetante, com intuito de reduzir ou até mesmo eliminar o risco de novas infecções nas glândulas mamárias. A imersão em solução desinfetante poderá ser feita pelo uso de caneca para imersão de tetos, especialmente as de

modelos “sem retorno”, que impedem o retorno da solução após contato com o teto (LINHARES, 2021).

A implementação do programa de Boas Práticas de Fabricação (BPF) em queijarias artesanais para melhora do ambiente e da manutenção dos recursos naturais é fundamental, pois, traz benefícios para os produtores rurais de diversas formas, principalmente na melhora da qualidade dos alimentos, evitando que estes ofereçam perigos de natureza física, química e biológica (SILVA, 2022).

1.5 Legislação

A fabricação de produtos artesanais durante muitas décadas foi marginalizada, pois a legislação criada em 1950 para regulamentar a inspeção sanitária do setor industrial também era aplicada aos produtos produzidos de forma empírica pelos produtores. Isso implicou na dificuldade de comercialização, tendo em vista que o modo de produção e o controle de qualidade para adequação aos parâmetros exigidos por lei distanciam-se enormemente do modo de produção industrial (CAMPOS, 2019; FERNANDES, 2021.)

O Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), mediante a Resolução N° 7 do ano de 2000, estabeleceu uma regularização da produção e comercialização dos queijos artesanais através do Serviço de Inspeção Federal. Resolução essa que descreve quais condições a maturação deve acontecer, nesse caso, são colocados no mínimo 21 dias, com exceção do queijo produzido através do leite cru, no qual, a maturação deve ocorrer em 60 dias para sua posterior comercialização. Esses requisitos causaram burocracia na comercialização e limitavam o processo de maturação. Como forma de auxiliar os produtores, o governo do Estado de Minas Gerais por meio do IMA e com o apoio da Empresa de Assistência Técnica e Extensão Rural do Estado de Minas Gerais (EMATER-MG), o programa de melhoria na produção de queijo Minas artesanal foi criado permitindo que a comercialização do produto fosse feito através do leite cru dentro do Estado (MONTEIRO; CHAVES, 2020).

A partir de 2011 por meio da Instrução normativa N° 30 do MAPA, os queijos artesanais tradicionalmente elaborados a partir de leite cru passaram a ser maturados por um período inferior a 60 (sessenta) dias. No entanto, foi preconizado a necessidade da inocuidade e a qualidade serem comprovadas com análises técnicas devido a redução desse período de maturação, tendo a abertura da comercialização das demais regiões que tivesse essa certificação (ANDRADE, 2013). O IMA

estabelece a Portaria de nº 2033, de 23 de janeiro de 2021, que dispõe os parâmetros e padrões físico-químicos e microbiológicos de alimentos de origem animal e para a água de abastecimento (IMA, 2021).

1.6 Qualidade microbiológica do queijo Minas artesanal

Para a produção do QMA o leite cru é a principal matéria-prima. Além de ser uma fonte de importantes nutrientes presentes no queijo (proteínas de alto valor biológico, lactose, lipídeos, vitaminas e cálcio), ele contém uma variedade de bactérias, as quais, tem participação no processo de maturação (SALES, 2015).

A atenção às questões sanitárias do leite que dará origem aos produtos artesanais, é vital, pois o processo quando mal executado coloca em risco a saúde pública (FIGUEREIDO, 2018).

A legislação exige a utilização de rebanhos sadios, livres de doenças infectocontagiosas e cujos testes oficiais de zoonoses apresentem resultados negativos. Também, prevê a possibilidade do Estado fornecer auxílio para a realização de exames de brucelose e tuberculose, e a reposição de matrizes em caso de morte através dessas doenças (MINAS GERAIS, 2012).

A água também é um insumo muito importante, principalmente, no ambiente de ordenha, sendo utilizada tanto nos equipamentos quanto nos tetos das vacas. Com falhas na sanitização, a água pode atuar como veículo de transmissão de microrganismos patogênicos, comprometendo a qualidade do leite, visto que, passa diretamente pela superfície contaminada. (FERREIRA, 2021). O QMA apresenta uma comunidade microbiológica bastante heterogênea que pode ser constituída de microrganismos tanto desejáveis quanto indesejáveis. Microrganismos desejáveis são as bactérias ácido-láticas, importantes como agentes fermentativos por apresentarem diversas enzimas glicolíticas, proteolíticas e lipolíticas, responsáveis por transformar os nutrientes em compostos com propriedades sensoriais desejáveis, além de produzirem fatores antimicrobianos, como ácidos orgânicos, bacteriocinas, diacetil e acetaldeído, que podem atuar benéficamente nos alimentos (MELLO, 2022). Já os microrganismos indesejáveis são deteriorantes e/ou patógenos que, presentes nos queijos, podem causar problemas sanitários em todo processo de produção (FARIA, 2017; NEOPROSPECTA, 2019).

1.6.1 Microrganismos indesejáveis

1.6.1.1 *Staphylococcus*

O gênero *Staphylococcus* é formado por cocos Gram-positivos, não esporulados, com cerca de 0,5 a 1,5 μm de diâmetro e com colônias relativamente grandes. As colônias são opacas, convexas e cremosas, podendo ser brancas ou ter um tom amarelado dependendo da espécie (RODRIGUES, 2011).

São microrganismos mesófilos com temperatura de crescimento entre 7 e 47,8°C, sendo conhecidas como espécies produtoras de exotoxinas termorresistentes em uma temperatura ótima de 40 a 45°C. Este grupo tem a capacidade de sobreviver e multiplicar em altas quantidades cloreto de sódio, se referindo a alimentos curados, como os queijos. A atividade de água (a_w) é considerada mínima para a sua metabolização quando comparados a outras bactérias halófilas. Sendo assim, é um grupo de bactérias que, através dessas versatilidades, consegue crescer com facilidade (FAVILLA, 2017).

Existem alguns fatores que são utilizados na pesquisa epidemiológica para validar a capacidade enterotoxigênica do gênero *Staphylococcus*. A produção de coagulase é um dos fatores de virulência mais aceitos. Se trata de uma enzima extracelular que transforma o fibrinogênio em fibrina e, conseqüentemente, a coagulação do plasma sanguíneo, sendo assim, usado para identificar cepas como o *S. aureus* (SANTANA *et al.*, 2010).

Os estafilococos são diferenciados em dois grupos usando o teste de coagulase: coagulase positiva, geralmente patogênicos, tendo em alguns casos capacidade de colonização assintomática; e os coagulase negativa, sejam saprófitas ou causadores de infecções oportunistas (GONZÁLEZ-MARTÍN *et al.*, 2020). O risco causado por cepas de coagulase positivas em alimentos contaminados se deve pela produção de toxinas termoestáveis. Na água e em alimentos é comum a contaminação de cepas como o *Staphylococcus aureus*, sendo um microrganismo que faz parte da microbiota natural do ser humano, sendo assim, o processo de contaminação é facilitado. Essas toxinas conferem característica de resistência, de modo que, os processos de pasteurização e ultrapasteurização se tornam inúteis para sua eliminação. Nesse caso, a intoxicação estafilocócica tem seu início violento havendo sintomatologias, como náuseas, vômitos, cólicas e prostração, e podendo apresentar outros sintomas à medida que se torna mais grave, como cefaleia, câibras musculares, e modificações de pressão e pulsação (ARAÚJO *et al.*, 2022).

A legislação apresenta um padrão somente para o grupo de coagulase positiva devido à presença de superantígenos, no qual, a relevância baseia-se em vários surtos de doenças de forma global e o fato de ser uma toxina termoestável (OLIVEIRA, 2021). Entretanto, Mendes (2018) menciona em seu trabalho que a presença em grandes quantidades do grupo de *Staphylococcus* coagulase negativa são de grande relevância para a saúde alimentar, pois já existem relatos que esses microrganismos também podem produzir a toxina da Síndrome de Choque Tóxico, tendo como consequência, uma intoxicação alimentar.

1.6.1.2 *Salmonella* spp.

As bactérias do gênero *Salmonella* são bacilos Gram negativo, não espiralados, anaeróbios facultativos e pertencentes à ordem Enterobacterales. A sua presença em alimentos é de grande preocupação, pois trazem problemas à saúde caracterizados por náuseas, febre, dor abdominal, vômitos ligados à desidratação, podendo desencadear sequelas crônicas como a artrite (LUZ *et al.*, 2020). É um grupo de grande importância quando se fala em Doenças Transmitidas por Alimentos (DTAs), em que estão entre os principais patógenos envolvidos. A transmissão ocorre principalmente através de produtos de origem animal que são consumidos por humanos, sendo microrganismos que conseguem sobreviver em ambientes com baixas temperaturas (CAETANO;PAGANO, 2019).

A salmonelose ocorre quando a *Salmonella* é ingerida em uma quantidade considerável, na qual, o microrganismo seja capaz de se multiplicar nas células intestinais liberando toxinas que provocam uma destruição dessas células, e assim, desencadeando um processo inflamatório. As subunidades da toxina LT que são liberadas em células alvo específicas desregulam a síntese de nucleotídeos cíclicos por ribosilação, outra é capaz de cessar a síntese proteica e uma terceira possui atividade fosfolipase A (PLA). A enterotoxina Snt (*Salmonella*-enterotixina) é um peptídeo biologicamente ativo que tem ação na AMPc que desencadeia um quadro diarreico (SEGUNDO, 2020).

O microrganismo tem uma grande importância para a saúde pública, uma vez que a maioria dos sorotipos são de caráter patogênico para o ser humano. Ademais, com espécies da bactéria mais relacionadas a alimentos, como as entéricas, esse fato viabiliza ainda mais a contaminação, uma vez que, alimentos como os ovos, podem ser facilmente contaminados, pois as aves infectadas são assintomáticas (SANTOS *et al.*, 2020). Esses animais de forma indireta, são também capazes de contaminar outros alimentos, tendo em vista que, em alimentos produzidos em propriedades familiares, a chance de ocorrer contaminação cruzada se torna maior.

2. OBJETIVO

2.1 Objetivo geral

Avaliar os parâmetros microbiológicos de queijo Minas artesanal da microrregião do Triângulo Mineiro com até 22 dias de maturação, produzido durante a estação da seca.

2.2 Objetivos específicos

- Quantificar *Staphylococcus* coagulase negativo e *Staphylococcus* coagulase positivo em QMA do Triângulo Mineiro em diferentes períodos de maturação (0, 10, 14, 17 e 22 dias).
- Investigar presença de *Salmonella* spp em QMA do Triângulo Mineiro em diferentes períodos de maturação (0, 10, 14, 17 e 22 dias).

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Coleta de amostra e local de desenvolvimento da pesquisa

Foi selecionado pela EMATER de Uberlândia um grupo composto por cinco produtores de QMA dos municípios de Araguari, Uberlândia e Monte Carmelo, registrados no SIM, IMA ou SIF que atendem aos critérios de interesse e disponibilidade. As coletas e as análises foram realizadas nos meses de julho e agosto de 2021, no período de seca.

As amostras foram coletadas por colaboradores da EMATER/MG em fazendas, enviadas para o Laboratório de Microbiologia da Universidade Federal de Uberlândia, Campus Patos de Minas e analisadas por colaboradores compostos por alunos de graduação e de mestrado dos cursos Engenharia de Alimentos e de Biotecnologia.

Foram utilizadas para o transporte caixas de isopor identificadas, higienizadas, vedadas e contendo gelo artificial, estrutura necessária para que não haja contaminação de forma externa e que a temperatura seja mantida em todo o percurso. Os queijos foram coletados com 0, 10, 14, 17 e 22

dias de maturação. A maturação ocorreu na própria fazenda, sob condições normalmente aplicadas no dia a dia.

3.2 Preparo das amostras

No preparo das amostras, os queijos foram partidos, picados e homogeneizados, obtendo-se $25 \pm 0,2$ g. Essa quantidade foi adicionada a uma garrafa contendo 225 ml de água peptonada tamponada e previamente esterilizada (Neogen) para formar a diluição 10^{-1} , e assim, posteriormente realizar diluições seriadas em tubos de ensaio. Foi transferido 1 mL da diluição anterior para tubos contendo 9 mL de água peptonada tamponada e esterilizada, até a concentração desejada, levando-se em consideração as contagens de microrganismos nas placas das amostras anteriores e o tempo de maturação dos queijos. Todo o processo de plaqueamento foi realizado em triplicata a partir das diluições selecionadas.

3.3 Contagem de *Staphylococcus* coagulase positiva e negativa

Para a contagem de *Staphylococcus* foi utilizado o meio ágar Baird Parker (BPA, Neogen) suplementado com gema de ovo contendo telurito de potássio. Foram selecionadas 3 diluições, sendo inoculadas em triplicata com auxílio de uma alça de Drigalski na superfície do meio de cultura. As placas foram incubadas a 36 ± 1 °C de 30 a 48 horas e para a contagem foram selecionadas aquelas que continham entre 20-200 colônias.

Foi realizada a contagem de colônias típicas e atípicas, sendo consideradas típicas aquelas negras brilhantes com anel opaco, rodeadas por um halo claro, transparente e com um destaque sobre a opacidade. Já colônias atípicas se apresentavam com cor acizentada ou negra brilhante, com ou sem a presença de halo. Posteriormente, as placas foram submetidas à coloração de Gram, e às provas da catalase e a coagulase.

Na coloração de Gram foram verificadas as características morfotinturiais. Em uma lâmina de microscopia foi feito esfregaço das colônias obtidas (atípicas e típicas) e fixadas pelo calor do bico de Bunsen. Logo em seguida, os esfregaços foram tratados com soluções: cristal violeta, lugol, etanol-acetona e fucsina. Essas lâminas foram analisadas em microscópios óticos de luz (Opton) com aumento de 1000x e com o auxílio de óleo de imersão. Ao analisar a morfologia foi esperado observar as colônias em formato de cocos, organizados em “cachos” e com uma colocação arrocheada.

Para a realização da prova de catalase foi acrescentado às colônias suspeitas gotas de peróxido de hidrogênio 3% (Êxodo) em uma lâmina de vidro para microscopia, observando-se a ocorrência ou ausência de liberação de bolhas. No teste, é possível verificar a decomposição do peróxido de hidrogênio, por enzimas produzidas pelo microrganismo, liberando oxigênio, evidenciado pela formação de bolhas.

O teste de coagulase consistiu em incubar as colônias selecionadas em caldo *Brain Heart Infusion* (BHI, Neogen) a 36° C por 24 horas. Em seguida, acrescentou-se plasma de coelho liofilizado (Coagulplasma, Laboclin), previamente ressuspendido em solução de cloreto de sódio (Dinâmica) solução a 1% estéril e os tubos foram novamente incubados a $36 \pm 1^\circ\text{C}$ por 6 horas. Com a ocorrência de coagulação não muito aparente, a incubação foi realizada até completar 24 horas. O teste tem como finalidade verificar a capacidade do microrganismo de transformar o plasma em coágulos visíveis após um período definido de incubação. Uma vez que, as espécies do gênero *Staphylococcus* possuem a enzima responsável por formar esses coágulos, é possível confirmar a presença do microrganismo.

Com os resultados obtidos das provas de coagulase, catalase e a coloração de Gram, a contagem final da presença do *Sphylococcus* foi expressos em LOG UFC/g.

3.4 Avaliação da presença de *Salmonella* spp.

Para a análise da presença de *Salmonella* spp. a diluição 10^{-1} preparada anteriormente foi incubada a 37° C em uma estufa de 16 a 24 horas. Posteriormente, na etapa de enriquecimento seletivo, foi retirada uma alíquota de 0,1 mL da amostra contida nos frascos e inoculada em um tubo contendo 5,0 mL do caldo Rappaport Vassiliadis (RV, Neogen). Os tubos foram incubados a $41 (\pm 0,5^\circ\text{C})$, em banho-maria, com agitação ou circulação contínua de água, de 24 a 30 horas. Após a incubação agitou-se manualmente o tubo de enriquecimento seletivo da etapa anterior e com auxílio de uma alça de inoculação foi feita a técnica de estriamento em meio Agardesoicolato-lisina-xilose (XLD, Neogen). As placas foram incubadas a 36°C, de 18 a 24 horas. Após a finalização do período de incubação, seguiu-se para a etapa final de confirmação. Observou-se o desenvolvimento das colônias nas placas, sendo consideradas colônias típicas de *Salmonella* spp. aquelas que apresentaram no ágar XLD com coloração negra, devido à formação de H₂S, lisas e com bordas arredondadas.

A verificação da presença da *Salmonella* spp. de todas as colônias (atípicas e típicas), foi realizada com o teste Reveal – Salmonella TestSystem (AOAC Licença 960801), de acordo com os procedimentos determinados pelo fornecedor.

3.5 Análises Estatísticas

Para análise estatística dos dados, foram utilizados os programas Graph Pad Prism versão 5.0. Devido à falta de normalidade e homogeneidade de variância, foram realizados testes não paramétricos.

Para a comparação dos resultados microbiológicos entre os dias de maturação avaliados, utilizou-se o teste de Mann Whitney devido a falta dos parâmetros para a ANOVA, seguida de post hoc de Dunn.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Contagem de *Staphylococcus coagulase positiva*

Os resultados da contagem de *Staphylococcus coagulase positiva* das amostras analisadas referente ao período da seca e nos dias de maturação 0, 10, 14, 17 e 22 estão representados na Tabela 1 e na Figura 3. Houve diferença significativa ($p < 0,05$) ao comparar os dias de maturação mediante aos valores da mediana.

Foram analisadas contagens altas de *Staphylococcus coagulase positiva* no primeiro dia de produção. E ao longo dos dias de maturação são verificadas oscilações nessas contagens.

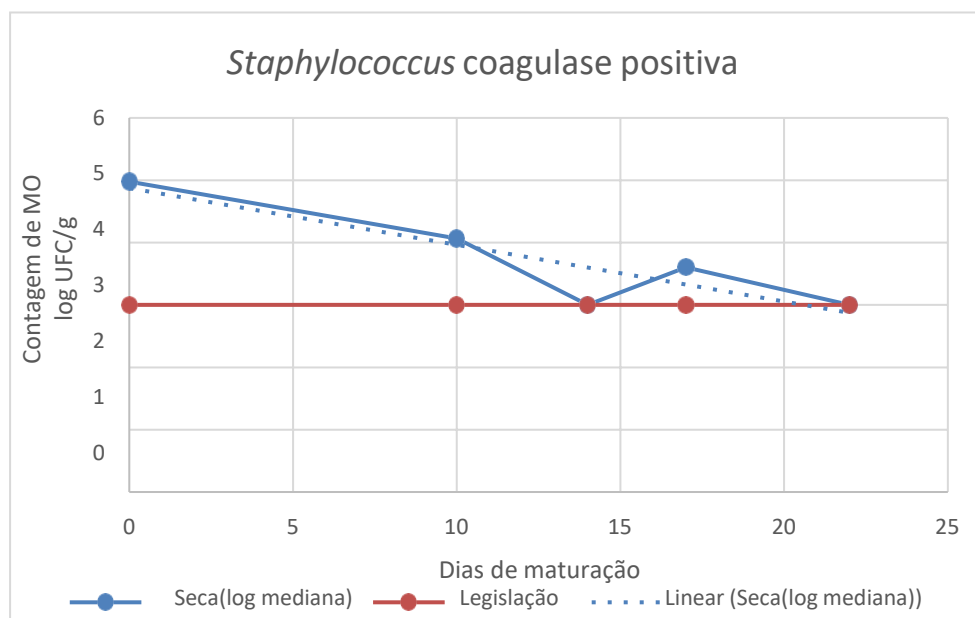
Tendo as análises realizadas em grupo, no primeiro dia de fabricação e no décimo de maturação somente um produto chegou no limite da legislação. No décimo quarto dia e no vigésimo segundo dia três do total conseguiram chegar. Já no décimo sétimo dia, somente dois produtos estavam dentro do padrão.

Tabela 1: Medianas (UFC/g), coeficientes de variação (CV) e % de produtores que atendem ao padrão da legislação para a contagem de *Staphylococcus coagulase positiva* em QMA do grupo de 5 produtores do Triângulo Mineiro durante 22 dias de maturação no período de seca.

Dias de Maturação	Mediana (UFC/g)	CV (%)	Legislação
0	$9,47 \times 10^4$ B	69,57	20% (1/5)
10	$1,16 \times 10^4$ B	146,82	20% (1/5)
14	$1,00 \times 10^3$ A	236,16	60% (3/5)
17	$4,00 \times 10^3$ B	199,07	40% (2/5)
22	$1,00 \times 10^3$ A	185,10	60% (3/5)

Medianas seguidas por letras distintas na linha, diferem entre si pelo teste Mann Whitney ($p < 0,05$) $n=5$. Valor padrão da legislação $1,00 \times 10^3$ segundo a Portaria IMA 2033 de janeiro de 2021.

Figura 3 – Contagem de *Staphylococcus* coagulase positivo ao longo do processo de maturação em um período da seca do QMA do Triângulo Mineiro



Os queijos avaliados no dia de fabricação e no décimo dia apresentaram contagens elevadas de microrganismos. No décimo quarto dia de maturação, foi verificada uma redução na contagem atingindo o limite padrão exigido pela legislação. No entanto, no décimo sétimo dia de maturação ocorre novamente um aumento dessa contagem, seguida de uma nova oscilação, com declínio no vigésimo segundo dia até o limite permitido pela legislação. Mediante esses resultados e através do trabalho relatado por Cruvinel (2019), além da importância da produção de queijos artesanais seguir o padrão exigido pela legislação, existem vários parâmetros na parte da manipulação que podem ser interferentes na garantia de uma boa qualidade do produto final: o uso de utensílios e recipientes; uso da matéria prima (leite) e de aditivos (pingo, sal e coalho); uso da fonte de água; vestimenta do manipulador; e inconformidade quanto a higiene pessoal.

O local de maturação também pode ter sido um fator interferente nos resultados no processo de maturação. A utilização de prateleiras de madeira ainda é uma forma comumente utilizada para cura de queijos feitos de forma artesanal. O IMA através da Portaria Nº518, de 14 de junho de 2002, permitiu o uso do material. A sua superfície consiste de porosidades que facilitam o processo de contaminação, sendo assim, um material que em sua grande maioria não pode ser limpo e desinfetado, além de sofrer fácil desgaste (SILVA, 2019). A formação de biofilmes em estruturas porosas é facilitada, uma vez que, essas comunidades de bactérias, como as da espécie

Staphylococcus aureus, produzem uma matriz polimérica que aderem de forma resistente a superfícies, sendo resistentes a procedimentos de saneamento. Essa colonização atinge de forma negativa o produto, pois eleva a contagem de microrganismos indesejáveis (BENINCÁ, 2018).

Fatores intrínsecos aos queijos no processo de maturação como a perda de umidade, o aumento de acidez, a queda de pH e a concentração de sal, além de conferir sabor e textura característica, inibem o crescimento de microrganismos. Porém, existem casos em que esses fatores não são suficientes para a diminuição de contagem devido a tolerância dos microrganismos a esses fatores. Além dos processos de manipulação e do local de maturação, a qualidade do leite também pode modificar o produto final (BENINCÁ, 2018). Sudré (2018) aborda em seu trabalho a importância de fatores como raça, espécie, estado nutricional, individualidade, saúde e estágio de lactação do animal para uma determinada qualidade do leite e, como consequência, as características dos queijos. O leite como matéria-prima para fabricação de queijos deve ser proveniente de animais sadios com baixa contagem de células somáticas (ausência de inflamações nas glândulas mamárias), livre de impurezas químicas, odores e ácidos orgânicos que venham afetar o *flavour* do queijo e livre de antibióticos a fim de evitar a inibição das bactérias do fermento láctico. A mastite é uma enfermidade comumente acometidas nesses animais (SUDRÉ, 2018).

Em trabalhos como de Soares (2014), não foi verificada redução significativa na contagem de *Staphylococcus coagulase positiva* ao longo de 26 dias de maturação em queijos artesanais produzidos em Uberlândia.

Analisando os queijos na região de Araxá, Sales (2015) observou que a partir do 14º dia de maturação o limite do padrão da legislação foi atingido.

Em trabalho realizado pelo mesmo grupo de pesquisa, tendo como região avaliada o Cerrado, Rodrigues (2021) obteve em seus resultados em todos os dias de maturação avaliados uma contagem de *Staphylococcus coagulase positiva* dentro do padrão da legislação. Isso é positivo para os produtores da região e para a população consumidora, uma vez que, demonstra uma boa qualidade microbiológica do produto para a comercialização, antes mesmo de se completar os 22 dias de maturação exigidos por lei.

4.2 Contagem de *Staphylococcus coagulase negativa*

Na Tabela 2 e Figura 4, estão demonstrados os resultados das contagens de *Staphylococcus coagulase negativo* dos queijos analisados nos períodos de seca com 0, 10, 17 e 14 e 22 dias de maturação. Apesar da tendência de aumento no número de microrganismos, não houve diferença

significativa ($p < 0,05$) na contagem entre os dias de maturação avaliados.

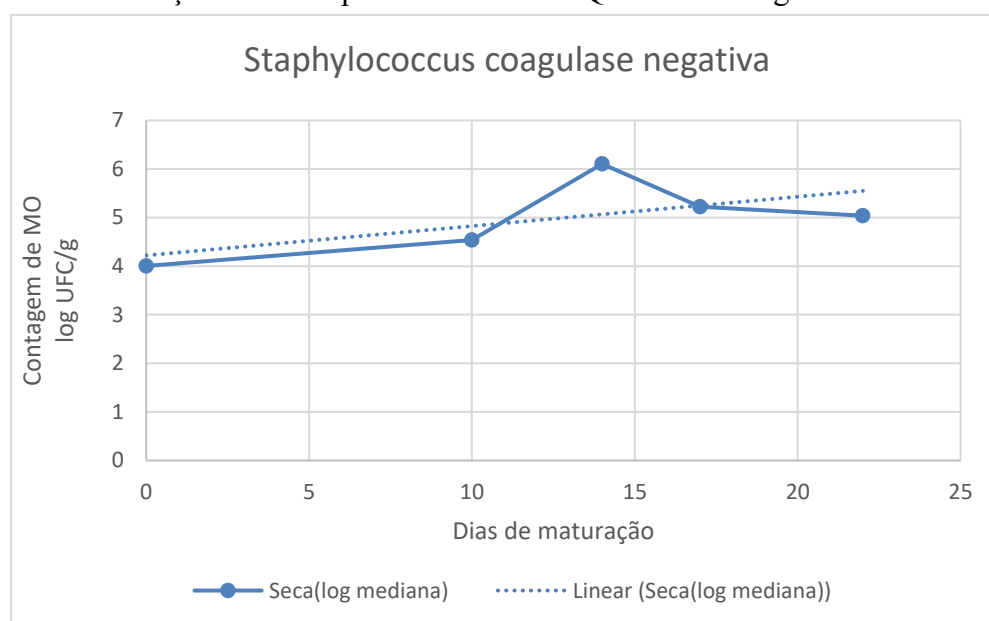
A tabela não traz as informações referentes aos valores correspondentes à legislação, uma vez que, não existe um padrão de contagem por meio da Portaria 2033, de 23 de janeiro de 2021.

Tabela 2: Medianas (UFC/g), coeficientes de variação (CV) que atendem ao padrão da legislação para a contagem de *Staphylococcus* coagulase negativa em QMA do grupo de nove produtores do Triângulo Mineiro durante 22 dias de maturação no período de seca.

Dias de Maturação	Mediana (UFC/g)	CV (%)
0	$1,01 \times 10^4$ ^A	272,62
10	$3,47 \times 10^4$ ^A	166,95
14	$1,27 \times 10^6$ ^A	109,11
17	$1,67 \times 10^5$ ^A	97,11
22	$1,09 \times 10^5$ ^A	144,13

Medianas seguidas por letras iguais na linha, equiparam entre si pelo teste Mann Whitney ($p < 0,05$) $n=5$.

Figura 4 – Contagens de *Staphylococcus* coagulase negativo ao longo do processo de maturação e em um período do ano do QMA do Triângulo Mineiro



O aumento na contagem de microrganismos pode ser justificado pela constante manipulação sem cuidados com a higiene necessária, principalmente, quando esses queijos são virados nas prateleiras ou bancadas diariamente (SANTOS, 2013). Medidas cautelosas são essenciais para a diminuição desses microrganismos, uma vez que, o processo de maturação não foi capaz de proporcionar essa redução. Rodrigues (2021), dentro do grupo de pesquisa com a região do Cerrado no período da seca, também obteve em seus resultados altas contagens do grupo de coagulase negativa, com aumento ao longo do período analisado.

O crescimento desse grupo de microrganismo é considerado um problema, tanto quanto o crescimento do grupo de SCP. Trabalhos como o de Silva (2022) relatam a existência de endotoxinas produzidas pelos SCN, o qual envolveu linhagens de *Staphylococcus* coagulase negativa e revelou genes relacionados com o potencial patogênico, além da sua importância como um reservatório de genes, que podem ser transferidos para outras bactérias presentes em um mesmo nicho ecológico.

4.3 Resultados de *Salmonella* spp.

Foi verificada a presença de *Salmonella* spp. em amostras com 10, 14, 17 e 22 dias de maturação de um único produtor no período avaliado. Tal fato se dá pelos possíveis fatores: contaminação na estrutura e área física pós-produção, manipulação durante a lavagem e viragem, contato com água e/ou utensílios contaminados e portador assintomático (MELO, 2021, RAMOS; SILVA; RIBEIRO; NASCIMENTO, 2021). Sendo assim, a necessidade das boas práticas, são importantes não só na prática da ordenha e no processo de fabricação, mas na pós produção.

Figueredo (2018) na região da Serra do Salitre e Resende (2014) na região de Campo das Vertentes, não identificaram o gênero *Salmonella* em nenhuma das amostras analisadas. Soares (2014), detectou *Salmonella* spp. em uma das 40 amostras analisadas no primeiro dia de maturação em queijos minas artesanais na região de Uberlândia. Lempk (2018) verificou a presença da bactéria em duas amostras de um grupo de dezoito amostras de queijos artesanais maturados em temperatura ambiente na cidade de Montes Claros. Rodrigues (2021) obteve em seu trabalho resultado positivo para *Salmonella* spp. em apenas uma amostra, com 1 dia de maturação, porém, nos outros dias de maturação não foi observada mais a presença.

CONCLUSÃO

No presente trabalho foi possível observar uma oscilação na contagem de *Staphylococcus* coagulase positiva, com maiores contagens deste microrganismo no início do processo de maturação. Em contraponto, o grupo de *Staphylococcus* coagulase negativa apresentou uma contagem alta em todos os períodos avaliados. Tais fatos podem ser resultado de condições higiênico-sanitárias insatisfatórias no momento da viragem, lavagem e/ou raspagem dos queijos; instalações inadequadas ou contaminadas na câmara de maturação; e ainda pela tolerância desses microrganismos a perda de

umidade, aumento de acidez, queda de pH e a concentração de sal.

Salmonella foi identificada em apenas uma amostra de queijo do décimo até o vigésimo segundo dia de maturação. Sugere-se que tenha ocorrido uma contaminação posterior ao de processo fabricação. Eventualmente, o manipulador das queijarias pode apresentar contaminação assintomática, ou ainda por se tratar de uma produção familiar, frequentemente, o mesmo indivíduo pode atuar em várias atividades, favorecendo contaminação cruzada.

O processo de maturação não foi eficiente na redução da contagem dos grupo de *Staphylococcus* coagulase negativa e positiva, além de não inibir a presença de *Salmonella*. É uma etapa que por si só não confere inibição ou a redução de microrganismos. Diante disso, melhorias na cadeia produtiva, com emprego das Boas Práticas Agropecuárias e de Fabricação, podem auxiliar os produtores na obtenção de um QMA de boa qualidade e dentro do padrão exigido pela legislação.

REFERÊNCIAS

ANDRADE JÚNIOR, F. P. de; LIMA, B. T. de M.; ALVES, T. W. B.; MENEZES, M. E. da S. Fatores que propiciam o desenvolvimento de *Staphylococcus aureus* em alimentos e riscos atrelados a contaminação: uma breve revisão. **Revista de Ciências Médicas e Biológicas**, [S. l.], v. 18, n. 1, p. 89–93, 2019.

ANDRADE, Antônio. **Instrução Normativa nº 30, de 07/08/2013**. 2013. Disponível em: <https://www.defesa.agricultura.sp.gov.br/legislacoes/instrucao-normativa-n-30-de-07-08-2013,1044.html>. Acesso em: 08 jan. 2023.

ANTONIO, M. B.; BORELLI, B. M. 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. 10.14295/2238-6416.v75i3.799.

ARAÚJO, J.P.A.; CAMARGO, A.C.; CARVALHO, A.F.; NERO, L.A.. Uma análise histórico-crítica sobre o desenvolvimento das normas brasileiras relacionadas a queijos artesanais. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, [S.L.], v. 72, n. 5, p. 1845-1860, set. 2020.

BENINCÁ, Maisa Cristina. Efeito inibitório de óleos essenciais contra *Staphylococcus aureus* multirresistentes e formadores de biofilmes. 2018. 83 f. Dissertação (Mestrado em Bioexperimentação) - Universidade de Passo Fundo, Passo Fundo, RS, 2018.

BONFIM, Renata Marques. **ESTUDO DA PROTEÓLISE DE QUEIJO MATURADO POR *Enterococcus faecium***. 2019. 34 f. Tese (Doutorado) - Curso de Química, Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Londrina, 2019.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa Nº62 de 26 de agosto de 2003. Métodos Analíticos Oficiais para Análises 96 Microbiológicas para Controle de Produtos de Origem Animal e Água. Brasília: Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, 2003. Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br/> Acesso em 10 de janeiro de 2020.

CAETANO, F.; PAGANO, M. Prevalência de infecções causadas por *Salmonella* sp. no Brasil no período de 2013 a 2017. **Journal Of Infection Control**, Porto Alegre, v. 8, n. 2, p. 1-7, 02 ago. 2019.

CAMPOS, G. Z. **Avaliação microbiológica de queijos minas artesanais provenientes da Serra da Canastra durante e após o período de maturação**. 91 p. 2019. Dissertação de mestrado. (Mestrado em Ciência de Alimentos). Universidade de São Paulo – USP. 2019.

CORSATO, Ana Cláudia Malagutti; KOTTWITZ, Luciana Bill Mikito; SEUCHUCO, Charles; PRAMIU, Debora; GAMBARO, Anna Caroline; FARIÑA, Luciana de Oliveira. Estudo da proteólise de queijos Coloniais da Serra Catarinense durante sua maturação em temperatura ambiente. *Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes*, [S.L.], v. 76, n. 1, p. 40-50, 31 dez.2021.

COSTA, Renata Golin Bueno; SOBRAL, Denise; PAIVA, Carolina Santiago; RODRIGUES, Ricardo Francisco; LIMA, Marciana de Souza; PAULA, Junio César Jacinto de; FONSECA, Natália Oliveira; SILVA, Marlúcia Pereira da; BORGES, Maria Cecília Oggioni; MARTINS, Marina dos Santos. Os queijos Minas artesanais – uma breve revisão. *Research, Society And Development*, [S.L.], v. 11, n. 8, p. 16911830012, 14 jun. 2022.

CRUVINEL, R. P. QUEIJO MINAS ARTESANALNO MUNICÍPIO DE COROMANDEL-MG. *Revista Agroveterinária, Negócios e Tecnologias*, Coromandel, v. 4, n. 1, p. 51-72, 07 jun. 2019.

FARIA, L.S. Prevalência e fatores de risco para *Coxiella burnetti* em queijos Minas artesanais da microrregião do Serro. 67 p. 2017. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Juiz de Fora. 2017.

FAVILLA, A. L. C. Detecção de genes que codificam toxinas, Leucocidina de PantónValentine e resistência a antibióticos em *Staphylococcus aureus* e estafilococos coagulase negativa isolados de queijo Minas frescal. Dissertação de Mestrado. Fundação Oswaldo Cruz. 118 p. Rio de Janeiro. 2017.

FERREIRA, S. G.; COSTA, B. S. A proteção do patrimônio cultural mineiro pela regulamentação da produção e comercialização dos queijos artesanais. *Prisma Jurídico*, [S.L.], v. 20, n. 2, p. 296-310, 20 dez. 2021.

FERNANDES, D. A. S. M. **Processamento do queijo manteiga artesanal maturado**. 2021. 45 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Produção Animal, Universidade Federal Rural do Semi-Árido, Mossoró, 2021.

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 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Veterinária, Escola de Veterinária da Ufmg, Belo Horizonte, 2018.

FOLCHINI, J. A. *et al.* **Boas práticas na fazenda e seu efeito sobre a qualidade microbiológica de queijos artesanais**. In: Simpósio de Alimentos, 10., 2018, Passo Fundo.

FOX, P. F.; GUINEE, T. P.; COGAN, T. M.; MCSWEENEY, P. L. H. *Fundamentals of Cheese Science*. 2. ed. New York: Springer, 2017.

GONZÁLEZ-MARTÍN, M.; CORBERA, J. A.; SUÁREZ-BONNET, A.; TEJEDOR-JUNCO, M. T. Virulence factors in coagulase-positive staphylococci of veterinary interest other than *Staphylococcus aureus*. **Veterinary Quarterly**, [S.L.], v. 40, n. 1, p. 118-131, 1 jan. 2020.

INSTITUTO MINEIRO DE AGROPECUÁRIA. Portaria IMA nº 2033, de 23 de janeiro de 2021. Dispõe sobre os parâmetros e padrões físico-químicos e microbiológicos de alimentos de origem animal e água de abastecimento. Belo Horizonte, 23 de janeiro de 2021. Disponível em: http://www.ima.mg.gov.br/index.php?preview=1&option=com_dropfiles&format=&task=frontfile.download&catid=1739&id=18428&Itemid=1000000000000. Acesso em: 02 de outubro de 2022.

IPHAN. Instituto do Patrimônio Histórico e Artístico Nacional. Disponível em: <http://portal.iphan.gov.br/noticias/detalhes/2033>. Acesso em 21 de setembro de 2022.

LEGISLATIVO. Assembleia Legislativa. Constituição (2019). Lei nº 13.860, de 18 de julho de 2019. Dispõe sobre a elaboração e a comercialização de queijos artesanais e dá outras providências. ...138. ed. Brasília, DF.

LEMPK, M. W. Influência do inóculo “rala” sobre as características físico-químicas, microbiológicas e reológicas do queijo Minas Artesanal do Serro – MG. Tese de 114 doutorado. 86 p. Universidade Federal de Minas Gerais - UFMG. Belo Horizonte. 2018.

LINHARES, Juliana Cosati *et al.* Avaliação das boas práticas agropecuárias (BPA's) na ordenha em relação à qualidade do leite. **Revista Getec**, Monte Carmelo, v. 10, n. 32, p. 10-36, 13 ago. 2021.

LIMA, Carla Ferreira. **ESTUDO DO TEMPO DE MATURAÇÃO DO QUEIJO MINAS ARTESANAL DO TRIÂNGULO MINEIRO: ANÁLISES MICROBIOLÓGICAS E FÍSICO-QUÍMICAS**. 2021. 122 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Engenharia de Alimentos, Universidade Federal de Uberlândia, Patos de Minas, 2021.

LUZ, Dirce Ferreira; SILVA, Tamara Ferreira da; MARCIEL, Sirlei Fernandes; OLIVEIRA, Marcus Vinicius Morais de. Incidência de *Salmonella ssp* e *Staphylococcus aureus* no leite de vacas da raça Pantaneira. **Brazilian Journal Of Animal And Environmental Research**, [S.L.], v. 3, n. 3, p. 973-982, 2020. BJAER - Brazilian Journal of Animal and Environmental Research.

MAGGI, Blairo. **Instrução Normativa MAPA nº 30 DE 26/06/2018**. 2018. Disponível em: https://www.normasbrasil.com.br/norma/instrucao-normativa-30-2018_364426.html. Acesso em: 13 jul. 2018.

MELO, Grace Kelly Alves de. **Avaliação microbiológica do queijo Minas Artesanal comercializado no mercado central da cidade de Montes Claros, norte de**. 2021. 32 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Produção Animal do Instituto de Ciências Agrárias, Universidade Federal de Minas Gerais, Montes Claros, 2021.

MEN, Thamiris Carolina Souza. **Propriedades probióticas in vitro de bactérias ácido-láticas isoladas de Queijo Minas Artesanal da região de Campo das Vertentes, Minas Gerais.** 2022. 82 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2022.

MENEZES, Maria Fernanda *et al.* MICROBIOTA E CONSERVAÇÃO DO LEITE. **Revista Eletrônica em Gestão, Educação e Tecnologia Ambiental**, [S.L.], v. 18, n. 22361170, p. 76-89, 5 jun. 2014. Universidad Federal de Santa Maria.

MENDES, Letícia Aparecida Barbosa. Avaliação da presença de estafilococos coagulase positiva em “queijo minas artesanal” comercializados na microrregião de Bom Despacho-MG. **Avaliação da Presença de Estafilococos Coagulase Positiva**, Formiga-Mg, v. 13, n. 1, p. 18-26, maio 2018.

MINAS GERAIS. Decreto nº 48.024. Dispõe sobre a produção e a comercialização dos queijos artesanais de Minas Gerais. Secretaria de Agricultura, Pecuária e Abastecimento de Minas Gerais. Belo Horizonte, 19 de agosto de 2020.

MINAS GERAIS. Lei nº 20.549 de 18 de dezembro de 2012. Dispõe sobre o processo de produção do Queijo Minas Artesanal e dá outras providências. Diário Oficial do Estado de Minas Gerais, Belo Horizonte. 2012.

Minas Artesanal. Patos de Minas, 2003. IMA. Instituto Mineiro de Agropecuária. Portaria nº 1397 de 13 de fevereiro de 2014. Identifica a Microrregião do Triângulo Mineiro como produtora de queijo Minas Artesanal. Disponível em: www.ima.mg.gov.br/institucional/portarias. Acesso em 03 de março de 2020.

Minas Artesanal. Patos de Minas, 2020. Instituto Mineiro de Agropecuária. Portaria nº 1.969 de 26 de março de 2020. 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 Queijo Minas Artesanal – QMA. Disponível em: <http://www.ima.mg.gov.br/institucional/portarias/1819-portarias/1965-portarias-ano-2020>. Acesso em: 29 de outubro de 2020.

MINAS GERAIS. Lei nº 14.185. Dispõe sobre o processo de produção do Queijo Minas artesanal e da providências. Secretaria de Agricultura, Pecuária e Abastecimento de Minas Gerais. Belo Horizonte, 31 de janeiro de 2002.

MINAS GERAIS. ASSEMBLÉIA LEGISLATIVA DO ESTADO DE MINAS GERAIS. Lei nº 20.549, 18 dez. 2012. Dispõe sobre a produção e a comercialização dos queijos artesanais de Minas Gerais. Diário do Executivo. Minas Gerais, Belo Horizonte, 19 dez. 2012. p. 1 col. 2. Disponível em: <http://www.almg.gov.br/>. Acesso em 19 de setembro de 2022.

MONTEIRO, Rodrigo Paranhos; CHAVES, Ana Carolina Sampaio Doria. O Queijo Minas Artesanal e seu potencial para agroindústria familiar. In: BRASIL. Rodrigo Paranhos Monteiro. Queijo Minas Artesanal: valorizando a agroindústria familiar. Brasília: Embrapa, 2018. p. 17-34. Disponível em: <http://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/infoteca/handle/doc/1110220>. Acesso em: 29 set. 2020.

MONTEIRO, R. P; MATTA, V. P. da. **Queijo Minas Artesanal Valorizando a Agroindústria Familiar**. 23. ed. Brasília: Embrapa Agroindústria de Alimentos, 2018. 102 p.

NASCIMENTO, D. **Decreto regulamenta o Selo Arte e o Selo Queijo Artesanal**. 2022. Disponível em: <https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/noticias-2022/decreto-regulamenta-o-selo-arte-e-o-selo-queijo-artesanal>. Acesso em: 01 jul. 2022.

NEOPROSPECTA. **Bactéria ácido láctica na indústria: o método molecular pode otimizar a identificação?** 2019. Disponível em: <https://blog.neoprospecta.com/bacteria-acido-lactica-industria-molecular-identificacao/>. Acesso em: 30 jul. 2019.

NETA, Izabel Bastos Pereira; SILVA, Adriana Rodrigues da; SANTOS, Giselly Monique do Carmo; ATHIÊ, Thayná Silva; REIS, Wiviane Cristina Silva; SEIXAS, Vitória Nazaré Costa. Aplicação das boas práticas agrícolas na produção de leite. **Pubvet**, [S.L.], v. 12, n. 5, p. 1-8, maio 2018.

OLIVEIRA, T. R. M. de. **Staphylococcus aureus EM ALIMENTOS COMO PROBLEMA DE SAÚDE PÚBLICA: UMA REVISÃO**. 2021. 55 f. TCC (Graduação) - Curso de Nutrição, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2021.

PAULA, P. L. M de. Caracterização tecnológica de Enterococcus faecium isolados de queijos artesanais. 2019. 63 f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos) - Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Londrina, 2019.

RAMOS, G. L. de P. A.; SILVA, G. M. M.; RIBEIRO, W. A.; NASCIMENTO, J. dos SRESE. SALMONELLA SPP. EM PRODUTOS LÁCTEOS NO BRASIL E SEU IMPACTO NA SAÚDE DO CONSUMIDOR. **Avanços em Ciência e Tecnologia de Alimentos - Volume 4**, [S.L.], p. 254-266, 2021. Editora Científica Digital.

RESENDE, E. C. Aspectos Sensoriais e Microbiológicos do Queijo Minas Artesanal da Microrregião Campos das Vertentes. Orientador: Fernando Antônio Resplande Magalhães. 2014. 114 f. Dissertação (Mestrado Profissional em Ciência e Tecnologia do Leite e Derivados) – Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora, 2014.

RODRIGUES, I. C. B. **Caracterização do Queijo Minas Artesanal do Cerrado**. 2021. 130 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Engenharia de Alimentos, Universidade Federal de Uberlândia, Patos de Minas, 2021.

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. 107 p. 2015 Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2015.

SANTIAGO-LÓPEZ, L.; AGUILAR-TOALÁ, J. E.; HERNÁNDEZ-MENDOZA, A.; VALLEJO-CORDOBA, B.; LICEAGA, A. M.; GONZÁLEZ-CÓRDOVA, A. F.. Invited review: bioactive compounds produced during cheese ripening and health effects associated with aged cheese consumption. **Journal Of Dairy Science**, [S.L.], v. 101, n. 5, p. 3742-3757, maio 2018.

SANTANA, E.H.W. *et al.* Estafilococcus em alimentos. **Aquivo do Instituto de Biologia**, São Paulo, v. 77, n. 3, p. 546-554, set. 2010.

SANTOS, Karina Paula Oliveira dos; FARIA, Ana Claudia dos Santos Reis; SILVA, Débora Patrícia Andrade; LISBOA, Priscila Fortunato; COSTA, Alexandre de Pina; KNACKFUSS, Fabiana Batalha. Salmonella spp. como agente causal em Doenças Transmitidas por Alimentos e sua importância na saúde pública: revisão. **Pubvet**, [S.L.], v. 14, n. 10, p. 1-9, out. 2020. Editora MV Valero.

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.

SEGUNDO, Rogério Ferreira; MESSIAS, Cassio Toledo; SILVA, Tamyres Izarely Barbosa da; FREITAS, Henrique Jorge de; ARAËJO, Danielle Saldanha de Souza; MARCHI, Patrícia Gelli Feres de; SILVA, Lidianne Assis; QUEIROZ, Adriano Melo de. Salmonelose ocasionada por produtos de origem animal e suas implicações para saúde pública: revisão de literatura / salmonellosis occasioned by products of animal origin and its implications for public health. **Brazilian Journal Of Animal And Environmental Research**, [S.L.], v. 3, n. 4, p. 3715-3746, 2020. BJAER - Brazilian Journal of Animal and Environmental Research.

SEI/IPHAN. Serviço Público Federal/Instituto do Patrimônio Histórico e Artístico Nacional. **Parecer Técnico nº141/2021/COTEC IPHAN-MG/IPHAN-MG**. Ministério do Turismo. 2021. Disponível em: <https://www.gov.br/iphan/pt-br/assuntos/noticias/aberta-consulta-publica-sobre-o-modo-artesanal-de-fazer-queijo-minas-e-o-modo-de-fazer-a-viola-de-cocho/ParecertnicoRevalidaoModoArtesanaldeFazerQueijoMinas.pdf>. Acesso em: 23 de outubro de 2022.

SOARES, D. B. **Caracterização físico-química e microbiológica de queijo Minas artesanal na região de Uberlândia – MG**. Orientadora: Daise Aparecida Rossi. 2014. 124 f. (Mestrado em Ciência Veterinária) – Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2014.

SOARES, Driene Bastos; MONTEIRO, Guilherme Paz; FONSECA, Belchiolina Beatriz; FREITAS, Eduardo Almeida; MENDONÇA, Eliane Pereira; MELO, Roberta Torres de; IASBECK, Jocasta Rodrigues; ROSSI, Daise Aparecida. **ANÁLISE SANITÁRIA E FÍSICO-QUÍMICA E ADEQUAÇÃO BACTERIOLÓGICA DO QUEIJO MINAS ARTESANAL PRODUZIDO EM DUAS PROPRIEDADES. *Ciência Animal Brasileira*, [S.L.], v. 19, n. - 36499, p. 1-11, 3 set. 2018.**

SILVA, Drielle Souza e. **Avaliação do potencial enterotoxigênico de linhagens de *Staphylococcus coagulase positiva* isoladas de queijos minas artesanal.** 2019. 48 f. Monografia (Especialização) - Curso de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2019.

SILVA, Lavinia Ventura da *et al.* Boas práticas na produção de queijos artesanais: uma revisão sistemática da literatura. ***Diversitas Journal***, Santana de Ipanema, v. 7, n. 2, p. 639-651, 04 jan. 2022.

SILVA, Luza Mabel Rocha da. **Produção de queijo artesanal em Cantagalo-MG: percepções e desafios.** 2019. 55 f. TCC (Graduação) - Curso de Agronomia, Instituto Federal de Minas Gerais, São João Evangelista, 2019.

SILVA, Nayara de Oliveira Gonçalves da. **Análise da virulência e resistência a antimicrobianos em linhagens de *Staphylococcus spp.* através de técnicas de genômica e proteômica.** 2022. 88 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Medicina, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Botucatu, 2022.

SUDRÉ, Bruna Gabriela Siqueira Souza. **QUEIJO MINAS ARTESANAL: Ocorrência de *Staphylococcus coagulase positiva* resistente a antibióticos e aceitação sensorial em relação a queijos industrializados.** 2018. 82 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri, Diamantina, 2018.

TEKIN, A.; GÜLER, Z. Glycolysis, lipolysis and proteolysis in raw sheep milk Tulum cheese during production and ripening: effect of ripening materials. *Food Chemistry*, [s.l.], v. 286, p. 160-169, 2019. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.01.190>.