



JESSICA RAQUEL SALES CARVALHO DE SOUZA

**COMPORTAMENTO DE BACTÉRIAS PATOGÊNICAS EM
QUEIJOS ARTESANAIS DE MINAS DURANTE A
MATURAÇÃO**

**LAVRAS - MG
2024**

JESSICA RAQUEL SALES CARVALHO DE SOUZA

**COMPORTAMENTO DE BACTÉRIAS PATOGÊNICAS EM QUEIJOS
ARTESANAIS DE MINAS DURANTE A MATURAÇÃO**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciências dos Alimentos, para obtenção do título de Mestre.

Prof.^a Dra. Roberta Hilsdorf Piccoli
Orientadora

**LAVRAS-MG
2024**

**Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de Geração de Ficha Catalográfica da Biblioteca
Universitária da UFLA, com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).**

Souza, Jessica Raquel Sales Carvalho de.

Comportamento de bactérias patogênicas em queijos artesanais
de Minas durante a maturação / Jessica Raquel Sales Carvalho de
Souza. - 2023.

54 p.

Orientador(a): Roberta Hilsdorf Piccoli.

Dissertação (mestrado acadêmico) - Universidade Federal de
Lavras, 2023.

Bibliografia.

1. qualidade microbiológica. 2. Listeria monocytogenes. 3. pH.
I. Piccoli, Roberta Hilsdorf. II. Título.

JESSICA RAQUEL SALES CARVALHO DE SOUZA

**COMPORTAMENTO DE BACTÉRIAS PATOGÊNICAS EM QUEIJOS
ARTESANAIS DE MINAS DURANTE A MATURAÇÃO**

**BEHAVIOR OF PATHOGENIC BACTERIA IN ARTISAN CHEESES FROM
MINAS DURING MATURATION**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciências dos Alimentos, para obtenção do título de Mestre.

APROVADA em 14 de julho de 2023

Dr. Monique Suela Silva – UFLA
Dr. Cleube Andrade Boari – UFVJM
Dr. Luiz Ronaldo de Abreu – UFLA

Documento assinado digitalmente
 ROBERTA HILSDORF PICCOLI
Data: 18/03/2024 12:43:19-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof.^a Dra. Roberta Hilsdorf Piccoli
Orientadora

**LAVRAS-MG
2024**

AGRADECIMENTOS

Á Deus, por me conceder vida, saúde e força para alcançar mais uma vitória na minha trajetória profissional.

À Universidade Federal de Lavras e ao Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos pela oportunidade de realizar este trabalho.

À minha orientadora, professora Roberta, por ter me orientado, auxiliado, e também muitas vezes tranquilizado nos momentos das minhas dificuldades. Por todo conhecimento a mim transmitido, pela compreensão e apoio, minha eterna gratidão!!

Á minha mãe Graça, e ao meu noivo Filipe, por serem minha família, apoiarem minha jornada até aqui, e estarem comigo em todos os momentos.

Aos amigos feitos no laboratório de Microbiologia de Alimentos, Anderson, Pepe, Mônica, Angélica, Fernanda, Danilo, Bruna, Monique, Michele, Mariana, Natália, Cecilia, Thaynara, Daniele, Sabrina, Ana, João, pois me receberam de coração aberto em um local novo pra mim naquele momento. Em especial, agradeço ao Pepe, por ter estado lado a lado no experimento, assim como, Cecilia, Sabrina, Thayanara, Daniele e João que contribuíram ora ensinando ora me auxiliando na prática. Novamente agradeço ao meu noivo Filipe por também ter me auxiliado na realização das análises deste trabalho.

Ás queridas técnicas Pâmela e Cleusa pelo apoio dado em tantos momentos.

Aos professores do Departamento de Ciência dos Alimentos, pelos ensinamentos transmitidos.

Aos produtores de QAM e QMA onde realizei a coleta dos queijos para este estudo.

Ao CNPq e FAPEMIG, pelo financiamento da pesquisa e à Capes pela concessão da bolsa.

Enfim, agradeço a todos que de alguma forma participaram dessa conquista me auxiliando.

Agradeço com todo meu coração.

RESUMO

O estado de Minas Gerais é o maior produtor de queijos do Brasil, sendo reconhecido pela tradicional produção de queijos de fabricação artesanal. Os queijos artesanais mineiros, apresentam características bem diversas, devido as especificidades do processo de produção, porém possuem em comum, o uso do leite cru durante sua elaboração. A preocupação pelo consumo destes produtos, ocorre devido a casos de toxinfecções alimentares, associados a queijos contaminados com patógenos, dentre eles *Listeria monocytogenes*. Assim, a compreensão do desenvolvimento microbiano no queijo é importante, especialmente durante a maturação, visto que neste período, o ambiente intrínseco do queijo pode ser desfavorável ao estabelecimento e crescimento de microrganismos. Considerando estes aspectos, o objetivo deste estudo, foi de avaliar o comportamento microbiano, especialmente *L. Monocytogenes* inoculada, em função dos valores de pH e atividade de água (aw), obtidos ao longo do processo de maturação em queijos artesanais de Minas Gerais. Para isso, foram coletados dois tipos de queijos logo após sua salga, oriundos da região do Campos das Vertentes (QMA-CV) e da Serra da Mantiqueira (QAM-M). Em laboratório, as amostras foram inoculadas com *L. monocytogenes* ATCC 19117 (8 log UFC/mL) e armazenadas em sala de maturação durante 35 dias. À parte, amostras sem inoculação, foram avaliadas, no mesmo período de tempo, quanto à quantificação de *L. monocytogenes*, *Salmonella*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus* coagulase positiva, bactérias lácticas e fungos filamentosos e leveduras. O acompanhamento da viabilidade dos microrganismos foi realizada por método dependente de cultivo. Todas as amostras foram submetidas a medições de pH e aw. Os resultados indicaram que, nas condições propostas deste estudo, a população de *Listeria monocytogenes* inoculada reduziu ao longo do tempo de maturação, atingindo contagens de 3,15 log UFC g⁻¹ e 2,84 log UFC g⁻¹ nos QAM-M e QMA-CV, respectivamente. Mostrando que a maturação é eficiente em reduzir essa bactéria. Em nenhuma amostra não inoculada foram detectados *L. monocytogenes* e *Salmonella* sp.. O QAM-M apresentou contagem inicial (antes da maturação) de *Staphylococcus* coagulase positiva de 5,63 log UFC g⁻¹ e 3,63 log NMP g⁻¹ de *E. coli*, porém até o final da maturação, o número desses microrganismos foram reduzidos se mantendo dentro dos limites recomendados. No QMA-CV não inoculado, *Staphylococcus* coagulase positiva e *E. coli* não foram detectados. Ambas variedades de queijos apresentaram altas contagens totais de fungos e bactérias lácticas, bem como a redução da aw e do pH ao longo do tempo.

Palavras-chave: qualidade microbiológica; *Listeria monocytogenes*; pH; atividade de água; maturação.

ABSTRACT

The state of Minas Gerais is the largest cheese producer in Brazil, being recognized for its traditional production of artisanal cheeses. Artisanal cheeses from Minas Gerais have very different characteristics, due to the specificities of the production process, but they have in common the use of raw milk during their preparation. The concern about the consumption of these products occurs due to cases of food poisoning, associated with cheeses contaminated with pathogens, including *Listeria monocytogenes*. Therefore, understanding microbial development in cheese is important, especially during maturation, since during this period, the intrinsic environment of the cheese may be unfavorable to the establishment and growth of microorganisms. Considering these aspects, the objective of this study was to evaluate microbial behavior, especially inoculated *L. Monocytogenes*, as a function of pH and water activity (aw) values, obtained throughout the maturation process in artisanal cheeses from Minas Gerais. For this, two types of cheese were collected immediately after salting, coming from the Campos das Vertentes (QMA-CV) and Serra da Mantiqueira (QAM-M) regions. In the laboratory, the samples were inoculated with *L. monocytogenes* ATCC 19117 (8 log CFU/mL) and stored in a maturation room for 35 days. Separately, samples without inoculation were evaluated, in the same period of time, for the quantification of *L. monocytogenes*, *Salmonella*, *Escherichia coli*, coagulase-positive *Staphylococcus*, lactic acid bacteria and filamentous fungi and yeasts. Monitoring the viability of microorganisms was carried out using a cultivation-dependent method. All samples were subjected to pH and aw measurements. The results indicated that, under the conditions proposed in this study, the inoculated *Listeria monocytogenes* population reduced over the maturation time, reaching counts of 3.15 log UFC g⁻¹ and 2.84 log UFC g⁻¹ in QAM-M and QMA- CV, respectively. Showing that maturation is efficient in reducing this bacteria. *L. monocytogenes* and *Salmonella* sp. were detected in no non-inoculated sample. The QAM-M showed an initial count (before maturation) of coagulase-positive *Staphylococcus* of 5.63 log CFU g⁻¹ and 3.63 log MPN g⁻¹ of *E. coli*, however, until the end of maturation, the number of these microorganisms was reduced, remaining within the recommended limits. In uninoculated QMA-CV, coagulase-positive *Staphylococcus* and *E. coli* were not detected. Both varieties of cheese showed high total counts of fungi and lactic acid bacteria, as well as a reduction in aw and pH over time.

Keywords: microbiological quality; *Listeria monocytogenes*; pH; water activity; maturation.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	8
2	REFERENCIAL TEÓRICO	10
2.1	<i>Listeria monocytogenes</i>	10
2.1.1	Toxinfeccções alimentares associadas a <i>Listeria monocytogenes</i>	11
2.1.2	<i>Listeria monocytogenes</i> em queijos	12
2.2	Queijos Artesanais de Minas Gerais	12
2.2.1	Queijo Minas Artesanal da região do Campos das Vertentes	14
2.2.1.1	Processo de produção do Queijo Minas Artesanal	15
2.2.2	Queijo Artesanal Mantiqueira de Minas	17
2.2.2.1	Processo de produção do Queijo Artesanal Mantiqueira de Minas.....	17
2.3	Microrganismos presentes no queijo.....	19
2.3.1	Padrões microbiológicos de queijos fabricados artesanalmente	22
2.4	Maturação de queijos artesanais	23
3	MATERIAL E MÉTODOS	25
3.1	Coleta das amostras	25
3.2	Preparo e padronização do inóculo.....	25
3.3	Inoculação de <i>Listeria monocytogenes</i> no queijo e maturação ex situ.....	25
3.4	Quantificação de <i>Listeria monocytogenes</i> nos queijos inoculados	26
3.5	Parâmetros microbiológicos avaliados.....	26
3.5.1	Quantificação de bactérias láticas	26
3.5.2	Quantificação de fungos totais.....	26
3.5.3	Quantificação de <i>Escherichia coli</i>	27
3.5.4	Quantificação de <i>Staphylococcus aureus</i> coagulase positivo.....	27
3.5.5	Presença/Ausência de <i>Salmonella</i> sp	27
3.5.6	Presença/ausência de <i>L. monocytogenes</i>	28
3.6	Medições de pH e atividade de água	28
3.7	Análises estatísticas.....	28
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	29
4.1	Queijo Minas Artesanal do Campos das Vertentes	29
4.2	Queijo Artesanal Mantiqueira de Minas	35
5	CONCLUSÃO	42
	REFERÊNCIAS.....	43

1 INTRODUÇÃO

O queijo artesanal de Minas Gerais corresponde àquele elaborado com leite integral fresco e cru, cujo processo de beneficiamento, que ocorre na propriedade ou proximidades, visa agregar valor à produção leiteira e manter influências tradicionais e regionais que garantam a sua identidade e simbologia mineira. Os queijos artesanais de Minas Gerais englobam diferentes variedades de queijos artesanais, dentre estas têm-se o Queijo Minas Artesanal (QMA) e o queijo artesanal Mantiqueira de Minas, que é classificado como queijo artesanal de Minas.

Há especificidades no processo de produção do QMA que o difere dos demais tipos de queijos artesanais de Minas Gerais. O processo de produção de queijos artesanais de Minas diferem dentre as diferentes regiões produtoras, e são normatizados de acordo com condições de fabricação específica somente para sua variedade.

O queijo artesanal Mantiqueira de Minas é elaborado a partir do leite cru, com adição de fermento endógeno (pingo) e coalho. A massa formada é aquecida durante 40 minutos sob agitação e, posteriormente, após desenformagem é adicionada de sal, sendo permitido o uso de salmoura ou salga a seco. Após a enformagem, a prensagem do queijo é realizada mecanicamente e o mesmo segue para a etapa de maturação, durante o período mínimo de 14 dias.

O QMA também é elaborado a partir do leite cru, com adição de pingo, coalho e sal. No entanto, em sua fabricação, obrigatoriamente, o processo envolve a salga a seco e a prensagem deve ser realizada manualmente. Na microrregião do Campo das Vertentes, o processo de maturação, embora ainda não tenha sido estabelecido pela legislação, ocorre durante 22 dias.

Apesar de haver diferenças no processo de produção, a matéria-prima de ambos os queijos envolve o uso do leite cru e adição do pingo, que promovem características sensoriais únicas nos queijos. Tais características são atribuídas aos microrganismos desejáveis, que fazem parte da microbiota natural do leite e do ambiente, que variam de acordo com singularidade do modo de produção dos queijos e da região de onde se é produzido.

No entanto, além de microrganismos desejáveis, o uso do leite cru como matéria prima, constitui meio adequado para multiplicação de bactérias potencialmente patogênicas, como *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella* spp. e *Escherichia coli*, as quais podem ocasionar toxinfecções alimentares.

Listeria monocytogenes é uma bactéria que tem ganhado grande destaque dentre as causadoras de toxinfecções alimentares, e ocasiona a doença conhecida como listeriose. O

risco da ocorrência de *L. monocytogenes* em queijos, principalmente queijos de média e alta umidade, está associada a capacidade da bactéria de sobreviver a diversos fatores estressantes como pH mais baixos, baixa atividade de água e elevada concentração de sal.

Staphylococcus aureus é um dos principais agentes causadores de intoxicação alimentar, e também pode estar presente em queijos fabricados a partir de leite cru, devido a contaminação do leite causada por mastite e manipulação no processamento por portadores assintomáticos. Este patógeno tolera ampla faixa de pH, baixa atividade de água e alta salinidade.

Escherichia coli é uma bactéria comensal do intestino de animais e seres humanos, entretanto, existem diferentes patótipos que podem causar infecção intestinal por diferentes mecanismos. A higienização insuficiente em equipamentos e utensílios, bem como contaminação cruzada oriunda pelo manipulador, é a principal fonte de contaminação deste patógeno em queijos artesanais.

As infecções causadas por *Salmonella* spp. ocasionam uma doença conhecida como salmonelose. Este gênero bacteriano está amplamente distribuído na natureza, e são habitantes comuns no trato intestinal de muitos animais, como bovinos. Possuem capacidade de crescimento em condições de ampla variação do pH, baixa atividade de água e concentrações moderadas de sal.

Diante do contexto apresentado, a contaminação de alimentos por estes microrganismos é uma relevante questão de saúde pública. A maturação é um processo crucial que controla a presença de microrganismos indesejáveis visto que transformações físico-químicas e microbiológicas que se sucedem neste período desempenham um papel significativo na criação de um ambiente desfavorável ao estabelecimento e crescimento de microrganismos potencialmente patogênicos. Portanto, essa fase da produção dos queijos é importante para garantir a segurança do alimento.

Desse modo, o presente estudo foi desenvolvido visando contemplar dois objetivos: (1) avaliar a viabilidade de *Listeria monocytogenes* inoculada e parâmetros microbiológicos (*Staphylococcus aureus*, *Salmonella* spp. E *Escherichia coli*) em queijos artesanais de Minas produzidos na região da Serra da Mantiqueira e QMA produzidos na microrregião do Campo das Vertentes e (2) avaliar o pH e atividade de água, de ambos os queijos, durante o período de maturação de 35 dias.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 *Listeria monocytogenes*

O gênero *Listeria* pertence à família Listeriaceae (anteriormente conhecida como Corynebacteriaceae) e apresenta mais de 20 espécies reconhecidas (KASZONI-RÜCKERL *et al.*, 2020). Apesar do aumento de identificação de novas espécies, apenas a espécie *Listeria monocytogenes* é considerada patogênica para humanos, sendo causadora de uma doença infecciosa grave conhecida como listeriose. *L. monocytogenes* também é considerada patogênica para animais (Nwaiwu, 2020).

A bactéria *L. monocytogenes* é um bacilo curto (aproximadamente 0,5µm de diâmetro e 2,0µm de comprimento), gram-positivo, não esporulado, móvel, anaeróbico facultativo, psicotrófico, catalase-positivo e oxidase-negativo. É classificada como heterofermentativa, com produção de ácido lático, ácido acético e outros produtos finais a partir da fermentação da glicose e de outros açúcares (Jay, 1996; Oliveira *et al.*, 2018).

Listeria monocytogenes é uma bactéria considerada ubíqua e sua resposta adaptativa a diferentes fatores ambientais é a principal característica que fundamenta a persistência e disseminação na natureza (Kallipolitis; Gahan; Piveteau, 2020).

Pode crescer e sobreviver sob ampla variedade de condições estressantes. Possui ampla faixa de temperatura de crescimento, com características peculiares quanto a resistência térmica e pode multiplicar-se em temperatura de refrigeração. A faixa de temperatura de crescimento da bactéria varia de -0,4 a 50°C, sendo a temperatura ótima de multiplicação entre 30 e 37°C. Pode crescer em condições aeróbicas ou anaeróbicas, porém o crescimento é potencializado na presença de CO₂. Apresenta alto nível de osmotolerância, que permite crescimento em elevadas concentrações de sal (até 20%) e em baixa atividade de água (aw 0,91). Em relação ao pH, também possui ampla faixa de crescimento compreendendo valores entre 4,4 a 9,6, com pH ótimo de crescimento de 7,0 (Schuchat *et al.*, 1991).

Devido a disseminação, persistência no ambiente e as características de *L. monocytogenes*, os alimentos são os principais agentes veiculares da listeriose que está associada principalmente ao consumo de produtos lácteos (com destaque para o leite cru), queijos, carne vermelha, aves e alimentos prontos para o consumo (Montville; Matthews, 2008; Kallipolitis; Gahan; Piveteau, 2020).

2.1.1 Toxinfecções alimentares associadas a *Listeria monocytogenes*

A listeriose é considerada uma doença veiculada por alimentos de fundamental importância em saúde pública, devido a sua gravidade, elevada taxa de letalidade e a propensão de determinados indivíduos desenvolverem a doença (Barancelli *et al.*, 2011).

A população de risco é constituída por crianças, idosos, imunodeprimidos, grávidas, pacientes com câncer ou sob tratamento com drogas esteroidais ou citotóxicas, transplantados renais, alcoólatras e diabéticos (Donnelly, 2001; Mclauchlin *et al.*, 2004; Rocourt *et al.*, 2000). A listeriose também pode acometer indivíduos saudáveis que ingerem quantidades elevadas desse microrganismo (Frye *et al.*, 2002).

A dose mínima infecciosa para seres humanos não é determinada. No entanto, estima-se que varie entre 10^2 a 10^9 UFC (Unidades Formadoras de Colônia), dependendo da condição imunológica do hospedeiro e da virulência da cepa em questão (Vázquez-Boland *et al.*, 2001; Jemmi; Stephan, 2006).

A listeriose pode se manifestar de duas formas clínicas: não-invasiva limitada ao canal digestivo; e invasiva, quando *L. monocytogenes* ultrapassa a barreira intestinal e causa uma infecção sistêmica (Colagiorgi *et al.*, 2017).

A forma não-invasiva mais comum da listeriose, apresenta-se como doença gastrointestinal e acomete pessoas sem fatores de risco predisponentes. Em indivíduos saudáveis, a doença ocorre 24 h após a ingestão de grande quantidade de células da bactéria e pode perdurar por até 2 semanas (Cruz *et al.*, 2008a). Os sintomas clínicos da doença incluem gastroenterite, febre, cólicas abdominais, náuseas, diarreia e vômitos (Garrido *et al.*, 2010; Halbedel *et al.*, 2019).

Embora seja considerada rara em comparação com outras doenças veiculadas por alimentos, a listeriose em sua forma invasiva, apresenta uma alta taxa de mortalidade e afeta principalmente idosos, imunodeprimidos, mulheres grávidas e principalmente recém-nascidos (Li *et al.*, 2020). A listeriose possui um período de incubação que pode ser superior a até 60 dias. Quando diagnosticada corretamente, pode ser tratada com antibióticos como a penicilina e a ampicilina, porém é fatal em aproximadamente 20 a 30% dos casos (Nes, 2008; Goulet *et al.*, 2013).

Devido à gravidade da manifestação clínica da listeriose sistêmica nos indivíduos predisponentes, há uma grande preocupação das indústrias alimentícias e órgãos oficiais de regulamentação em termos de segurança dos alimentos. No Brasil apesar de não haver registros oficiais da doença sendo veiculados por alimentos, existem diversos estudos onde isolaram *L.*

monocytogenes em produtos como carnes, leite (cru e pasteurizado) e queijos (Moura; Destro; Franco, 1993; Ristori *et al.*, 2014; Sant'anA; Franco; Schaffner, 2014).

2.1.2 *Listeria monocytogenes* em queijos

A ocorrência de *L. monocytogenes* em leite e derivados lácteos tem sido relatada em muitos estudos (Barancelli *et al.*, 2011; Silva, 1998; Silva *et al.*, 2011a). Dentre os derivados lácteos, o queijo de alta e média umidade, é o alimento que mais está associado a surtos causados por *L. monocytogenes*. A contaminação dos queijos por *L. monocytogenes* também tem sido associada, principalmente, ao leite cru usado na fabricação ou ao ambiente de processamento (Barancelli *et al.*, 2011, Borges *et al.*, 2010).

A silagem contaminada é uma fonte clássica de infecção por *L. monocytogenes* em animais, que podem adoecer ou tornarem-se portadores assintomáticos, eliminando a bactéria nas fezes e no leite. Vacas com mastite provocada por *L. monocytogenes* eliminam números altos dessa bactéria no leite (Radostits *et al.*, 1994). Assim, a mastite causada por *Listeria* pode perpetuar os ciclos de transmissão de *L. monocytogenes* e altas cargas da bactéria podem representar uma fonte do patógeno em ambientes rurais. O leite cru utilizado na produção do queijo pode ser contaminado durante a ordenha, transporte ou armazenamento. Ele pode ser contaminado também durante a produção feita com utensílios e/ou ambiente contaminado pela bactéria (Campagnollo *et al.*, 2018a).

A presença de *L. monocytogenes* em leite cru é preocupante, pois o leite cru é usado na elaboração de queijos artesanais tradicionais. A ocorrência de *L. monocytogenes* tem sido relatada em diferentes tipos de queijos artesanais ao redor do mundo, como por exemplo na Colômbia (Jzramillo-Bedoya; Trujillo-Alzate; Ocampoibáñez, 2021), Polônia (Pyz-Lukasik *et al.*, 2021) e Bélgica (Gérard *et al.*, 2021). No Brasil, *L. monocytogenes* tem sido isolada em queijos artesanais produzidos tradicionalmente em regiões mineiras como nas regiões do Serro, Canastra, Araxá, Cerrado Mineiro (Camargo *et al.*, 2020, Allaion; Barrionuevo; Franco *et al.*, 2021).

2.2 Queijos Artesanais de Minas Gerais

No estado de Minas Gerais, a produção queijeira iniciou no século XVIII, após os portugueses trazerem a receita de um típico queijo produzido na Serra da Estrela. A técnica empregada, consistia em aplicar a flor do carpo ao leite de ovelha para promover a coagulação.

Com o passar do tempo, essa prática moldou-se aos costumes locais e se tornou uma herança cultural, transmitida pelas sucessivas gerações (Araújo *et al.*, 2020, Kamimura *et al.*, 2019).

Para além da tradição na produção do queijo artesanal, a atividade queijeira possui grande importância econômica em todo estado de Minas Gerais, considerando o expressivo número de produtores envolvidos neste segmento. De acordo com o levantamento do Sistema Safra Agroindústria (2021), realizado pela Empresa de Assistência Técnica e Extensão Rural (EMATER), cerca de 10.166 estabelecimentos se dedicam a produção de queijos artesanais, entre os 736 municípios contabilizados. Contudo, há um número significativo de agroindústrias familiares de queijo artesanais ainda não identificados por tipo ou região (Emater, 2021a).

Para serem comercializados, os queijos artesanais de Minas Gerais, devem ser produzidos com leite integral fresco e cru, apresentando características específicas de identidade e qualidade, com o beneficiamento *in loco* ou nas proximidades da propriedade. O reconhecimento de origem do queijo artesanal pode ser indicado pela produção em regiões delimitadas e certificadas pelo Instituto Mineiro Agropecuário (IMA), que através de levantamentos históricos, agroecológicos e climáticos, a caracterizam as regiões tradicionalmente produtoras (Figura 1) (Minas Gerais, 2018a).

As características dos queijos artesanais mineiros depende de vários fatores, como a raça do rebanho, a alimentação dos animais, as condições ambientais, o processo de fabricação do queijo, os ingredientes permitidos e os cuidados na maturação. Devido a isso, a variabilidade das práticas de manipulação e elaboração produzem produtos distintos e singulares (Emater, 2019a, Dores *et al.*, 2013).

Dentre as variedades de queijos produzidos em Minas Gerais, têm-se o Queijo Minas Artesanal (QMA) considerado um dos queijos mais antigos e tradicionais do Brasil. A importância histórica e social do modo artesanal de fazer o queijo Minas, tornou-o Patrimônio Cultural Imaterial Brasileiro pelo Instituto do Patrimônio Histórico e Artístico Nacional – IPHAN (Brasil, 2008; Rafael, 2017).

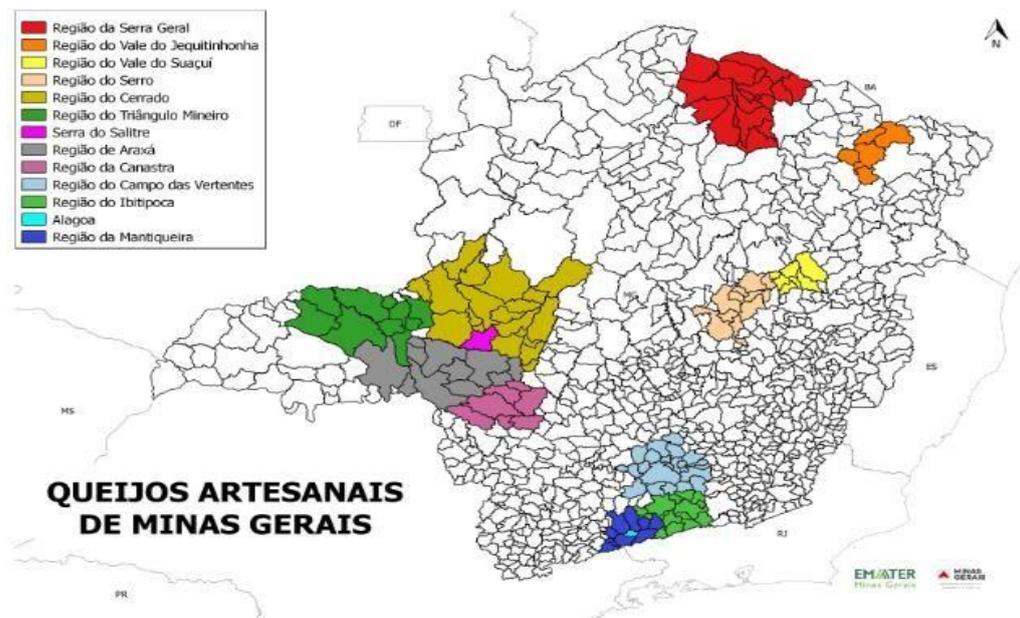
O QMA difere principalmente das demais variedades, devido ao processo de beneficiamento, o qual não sofre tratamento térmico e é prensado manualmente, conforme a tradição. Através da certificação do Instituto Mineiro de Agropecuária (IMA), são reconhecidas dez microrregiões queijeiras tradicionais produtoras do QMA, que incluem: Araxá, Campos das Vertentes, Canastra, Cerrado, Diamantina, Serra do Salitre, Serro, Triângulo Mineiro, Serras da Ibitipoca e Entre Serras da Piedade ao Caraça (Embrapa, 2019; Ima, 2021a).

A grande diversidade de queijos artesanais produzidos em todo estado, estimula a regulamentação contemplar outras variedades, para potencializar a cadeia produtiva do queijo

artesanal, contribuir para a manutenção da produção e desenvolver socialmente estas regiões (Bezerra, 2018). Devido a isso, outras regiões do estado também receberam o reconhecimento como áreas tradicionalmente produtoras de queijos artesanais, a partir de estudos de caracterização destas regiões (Minas Gerais, 2018).

O IMA reconhece cinco regiões produtoras de queijo artesanal de Minas (QAM) sendo elas Serra Geral (Minas Gerais, 2018b), Vale do Jequitinhonha (Minas Gerais, 2014a), Vale do Suaçuí, (Minas Gerais, 2014b) Alagoa (Minas Gerais, 2020a) e Serra da Mantiqueira (Minas Gerais, 2020b). Cada variedade fabrica o queijo com um processamento específico, que diferente do QMA, pode por exemplo, ser prensado mecanicamente, ter adição de ingredientes, como especiarias, ou sofrer algum tratamento térmico durante o beneficiamento. O regulamento estabelecido por ato normativo contempla as especificidades do processo de fabricação de cada queijo, conforme vinculação regional (Sobral *et al*, 2022; Emater, 2019a).

Figura 1 – Regiões reconhecidas pelo IMA como tradicionalmente produtoras de queijo artesanal em Minas Gerais.



Fonte: EMATER (2021b).

2.2.1 Queijo Minas Artesanal da região do Campos das Vertentes

Através da publicação da Portaria nº 1.022, em 03 de novembro de 2009, a microrregião do Campo das Vertentes, foi reconhecida pelo IMA como produtora de Queijo Minas Artesanal, integrando o Programa Queijo Minas Artesanal (Minas Gerais, 2009).

A microrregião do Campo das Vertentes ocupa uma área de 6.254 Km² e é composta por 15 municípios. A inclusão da microrregião Campos das Vertentes, permitiu que queijarias

pudessem se adequar à legislação pertinente, porém ainda há produtores que buscam se adequar legislação e obter a regularização da produção (Emater, 2009).

Atualmente, estão cadastrados 278 produtores de QMA em todo o estado mineiro, sendo seis pertencentes a microrregião do Campos das Vertentes distribuídos nas cidades de Coronel Xavier Chaves, Entre Rios de Minas, São João Del Rei, Carrancas e Tiradentes (Ima, 2021b).

Conforme registrado no dossiê de caracterização desta microrregião, este tipo de queijo é caracterizado por sua consistência semidura, com uma tendência à maciez, porém, firme. Sua textura é compacta, apresentando possíveis olhaduras irregulares. A casca é fina, exibindo uma coloração amarelo-palha. Quanto ao sabor, é pronunciado, levemente ácido, mas não picante. Em relação à forma, o queijo possui um formato cilíndrico, com altura aproximada entre 5 e 7 cm, diâmetro variando de 15 a 20 cm e peso que varia de 700 g a 1 kg (Emater, 2009).

Ainda não se tem uma definição do período de maturação queijos Minas artesanais baseado em estudos científicos para todas as microrregiões produtoras, sendo o período mínimo de maturação do QMA recomendado para a microrregião do Campo das Vertentes é de 22 dias ou pelo maior período especificado em estudos científicos (Minas Gerais, 2021).

2.2.1.1 Processo de produção do Queijo Minas Artesanal

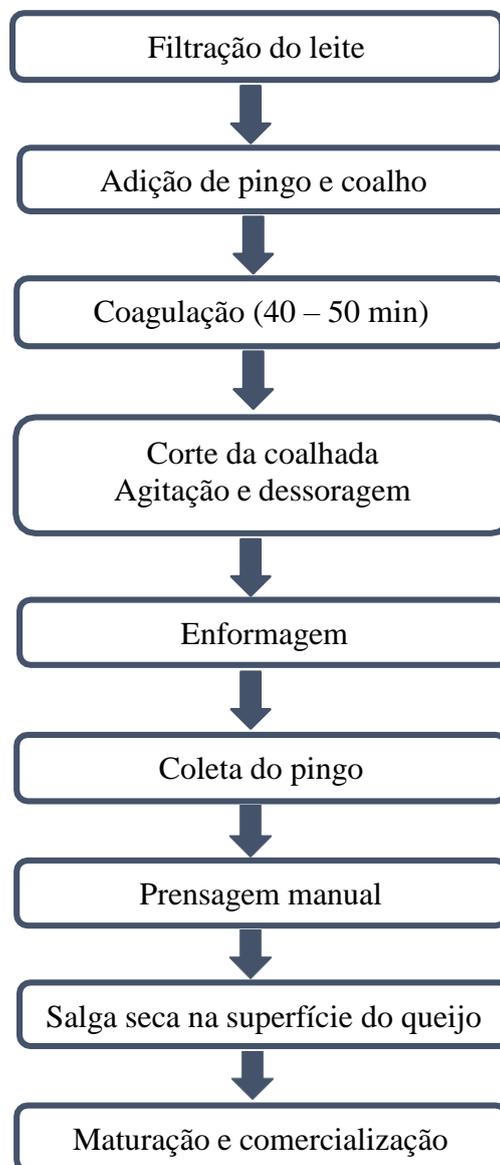
De acordo com a Lei Estadual – MG n ° 20.549/2012 em seu Art. 4º, o processo de produção do QMA é descrito em 10 fases que compreende as seguintes etapas: I filtração do leite; II adição de cultura láctica e coalho; III coagulação; IV corte da coalhada; V mexedura; VI dessoragem; VII enformagem; VIII prensagem manual; IX salga seca; X maturação (Minas Gerais, 2012).

O processo de fabricação do QMA deve ter início em até noventa minutos após o começo da ordenha, sendo que o leite não pode ter sofrido nenhum tratamento térmico, deve utilizar ingredientes obrigatórios, como coalho e culturas lácticas naturais (pingo, soro fermentado/soro-fermento) e a maturação ocorrer conforme o período estipulado para cada microrregião (Minas Gerais, 2012).

O período entre o início da fabricação do QMA até a fase de maturação do queijo, deve ter duração média de três dias. Após a obtenção do leite, através da ordenha manual ou mecânica, ocorre o processo de filtragem em suporte plástico ou metálico de inox. A partir desse processo, começa-se de fato a elaboração dos queijos, com adição do coalho e do pingo. O pingo consiste no soro-fermento salgado que é coletado da fabricação anterior, para uso na fabricação do dia. Após a coagulação do leite, é realizado o corte da massa e a mexedura com

intuito de retirar o excesso do soro acumulado. Subsequentemente a enformagem e prensagem manual, os queijos recebem por aspensão sal grosso em sua superfície, e após a viragem do queijo e repetição do processo, acondiciona-se o queijo sob uma bancada de ardósia para retirada do excesso de sal. Em seguida, os queijos são desenformados e colocados sobprateleiras de madeira, permitidas pela legislação, para iniciar a etapa de maturação, que modifica as propriedades químicas e físicas da massa do queijo, influência na textura e consistência, e forma compostos que serão responsáveis pelo desenvolvimento do sabor característico de cada variedade (Meneses, 2006; Embrapa, 2018).

Figura 2 – Fluxograma da produção do queijo Minas artesanal.



Fonte: Minas Gerais (2009).

2.2.2 Queijo Artesanal Mantiqueira de Minas

Através da publicação da Portaria nº 1.985, de 16 de junho de 2020, a microrregião Serra da Mantiqueira, foi reconhecida pelo IMA como produtora de queijo artesanal Mantiqueira de Minas, com base no estudo de caracterização integrada de municípios, realizado pela EMATER.

A microrregião da Serra da Mantiqueira possui uma área de 3.556 km² e é composta por 9 municípios (Figura 3), que incluem :Aiuruoca, Baependi, Bocaina de Minas, Carvalhos, Itamonte, Liberdade, Itanhandu, Passa Quatro e Pouso Alto. Estima-se que as populações das 9 cidades compreende cerca de 75.176 habitantes, sendo a população rural aproximadamente de 33,05% deste total (Emater, 2019b).

A cadeia produtiva de leite é uma importante atividade econômica da região. Segundo EMATER-MG, em 2017, houve uma produção de 119 milhões de litros de leite nas cidades que compreendem a microrregião da Serra Mantiqueira. Deste volume, parte do leite foi destinada à elaboração de queijos artesanais, por agricultores familiares (Emater, 2019b).

Conforme estabelecido para esta variedade, o queijo artesanal Mantiqueira de Minas possui consistência dura, textura tendendo a fechada, cor interna intermediária entre o branco a amarelada, sabor moderadamente salgado suave a picante e odor moderadamente pronunciado, conforme a tradição histórica e cultural da região onde é produzido (Minas Gerais, 2021b).

O período mínimo de maturação do queijo artesanal Mantiqueira de Minas é de 14 dias. A maturação pode ser feita a temperatura ambiente ou ser feita em ambiente climatizado (12 °C a 14 °C) (Minas Gerais, 2021b).

2.2.2.1 Processo de produção do Queijo Artesanal Mantiqueira de Minas

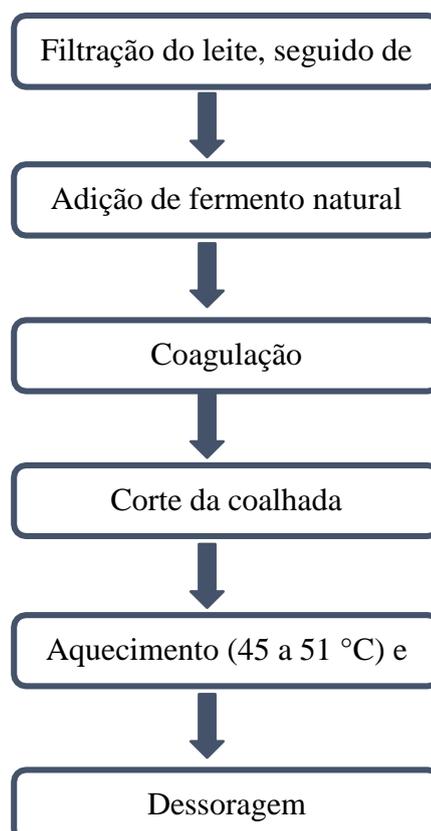
Segundo a Portaria n ° 2049, de 07 de abril de 2021, a tecnologia de elaboração do Queijo Artesanal Mantiqueira de Minas se desenvolverá com a observância das seguintes fases: I filtração do leite; II agitação; III adição de soro fermento (pingo); IV adição de colaho; V coagulação; VI corte da coalhada; VII aquecimento e mexedura da massa; VIII dessoragem; IX pré-prensagem; X prensagem e viragem; XI salmoura ou salga a seca; XII maturação (Minas Gerais, 2021b).

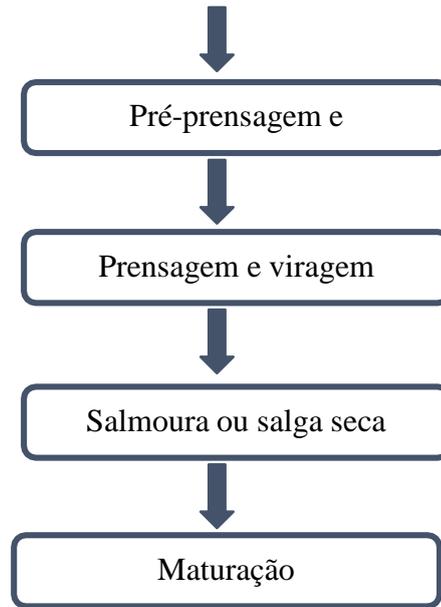
O processo de fabricação do queijo artesanal Mantiqueira de Minas, inicia a partir da coleta do leite cru, de produção própria, recém-ordenhado ou refrigerado. Após a coleta do leite, em latão ou ordenha mecânica, ocorre a coagem do leite em filtro ou coador, constituídos de

material lavável e higienizável. Em seguida, com a utilização de pás em aço inox ou polietileno, o leite é agitado. A partir de então, inicia-se de fato a elaboração dos queijos, com adição do pingo e do coalho. O pingo, é obtido a partir da mistura do soro do dia com o soro do dia anterior, com um volume de 3% a 6% em relação ao volume do leite. Após a etapa de coagulação, a massa é cortada e posteriormente aquecida entre 45 e 51 °C por aproximadamente 40 minutos, com constante agitação. Posteriormente a dessoragem, ocorre a enformagem, e prensagem do queijo, que pode ser realizada mecanicamente. Após desenformados os queijos são submetidos à salmoura, podendo ser ou não utilizado a salga a seca. Ao final do processo de viragem e descanso, o queijo é armazenado em câmara de maturação sob temperatura ambiente ou em ambiente climatizado, com temperatura entre 12 a 18 °C (Minas Gerais, 2021b).

Existem ingredientes opcionais, que podem ser utilizados isoladamente ou em combinação, como condimentos, especiarias, azeite e vinho, desde que estejam em conformidade com as regulamentações específicas e prontos para consumo na forma em que são apresentados. Na produção do queijo, também é permitido o uso de resinas após um período de maturação. Além disso, é permitido o processo de defumação do queijo (Minas Gerais, 2021b).

Figura 3 – Fluxograma da produção do queijo artesanal Mantiqueira de Minas.





Fonte: Minas Gerais (2021b).

2.3 Microrganismos presentes no queijo

A microbiota presente nos queijos artesanais é bastante diversificada, e de modo geral, é constituída por um grupo de microrganismos desejáveis e indesejáveis. As características ambientais de cada região produtora e o modo artesanal de fabricação do queijo, com o uso do leite cru associado a inoculação de culturas lácticas naturais (pingo), influenciam diretamente na população microbiana. Esses fatores são predisponentes a sucessões microbiológicas que ocorrem no produto (Sant'anna, 2018; Nunes, 2020).

As bactérias lácticas (BAL) são considerados microrganismos desejáveis na produção de queijos artesanais. Este grupo de microrganismos é classificado como gram-positivo, microaerófilos, catalase-negativos, não formadores de esporos, homo ou heterofermentativas, com morfologia de cocos ou bastões e não patogênicos. Essas bactérias podem desempenhar papéis diferentes durante a fabricação de queijos, onde algumas espécies participam do processo de fermentação, enquanto outras são encontradas na maturação do queijo (Pehrson, 2017; Rafael, 2017).

As BAL iniciadoras (microbiota *starter*), encontradas naturalmente no leite cru e no pingo, participam do processo de fermentação da lactose, que acidifica o leite, e assim afeta retenção e a ação do coagulante; estimula expulsão do soro; modifica a textura do queijo devido solubilização do fosfato de cálcio e controla e previne o crescimento de microrganismos indesejáveis (Walstra *et. al.*, 1999; Settanni; Moschetti, 2010).

As bactérias lácticas encontradas durante a maturação do queijo, indicadas como BAL não iniciadoras, sob atuação de enzimas lipolíticas e proteolíticas, afetam por fenômenos complexos características sensoriais e físicas dos queijos (Perry, 2004; Santos, 2010).

Os fungos constituem outro grupo de microrganismos de fundamental importância em algumas variedades de queijos artesanais, podendo fazer parte da microbiota desejável, devido a propriedades enzimáticas (lipólise e proteólise), que confere sabor e aroma agradáveis ao queijo. Entretanto, contagens elevadas pode ser indicativo de contaminação. Assim, também pode se comportar como microrganismo indesejável (Pinto, 2004; Oliveira, 2014).

De modo geral, os fungos são microrganismos resistentes às condições adversas como pH ácido e baixa atividade de água. No caso dos queijos artesanais, podem ter origem no leite cru, pingo ou ambiente de produção do queijo. Os fungos desenvolvem-se nos queijos artesanais durante a maturação, pois neste período a temperatura ótima de crescimento (25 a 30 °C) e disponibilidade de O₂ são favoráveis para o seu crescimento (Silva *et al.*, 2010; Epamig, 2019).

Já os microrganismos indesejáveis encontrados em queijos artesanais estão associados a condições higiene-sanitária da produção. Quando presentes, estes contaminantes afetam a qualidade do queijo por acelerar sua deterioração e comprometer a inocuidade do produto, podendo levar a algum dano a saúde do consumidor. Os principais contaminantes encontrados em queijos são: *Staphylococcus aureus*, *Salmonella* spp., *Escherichia coli* e *Listeria monocytogenes* (Andretta *et al.*, 2019).

Staphylococcus aureus são bactérias gram-positivas, em forma de cocos, em pares, com cadeias pequenas ou em cachos. São anaeróbias facultativas, imóveis e não produtora de esporos (Baird-Parker, 1990).

Staphylococcus aureus, é um dos principais agentes causadores de intoxicação alimentar, e pode estar presente em queijos fabricados a partir de leite cru, devido a contaminação do leite causada por mastite em bovinos e manipulação no processamento por portadores assintomáticos. Este patógeno tolera ampla faixa de pH (4,5 a 9,3), baixa atividade de água e alta salinidade (Trabulsi; Arterthum, 2016).

Estudos realizados visando avaliar a qualidade microbiológica de queijos artesanais produzidos em Minas Gerais, identificaram altas contagens de *S.aureus* (Soares *et al.*, 2018 Pinto *et al.*, 2017, Santos *et al.*, 2017). Apesar do processo de maturação auxiliar na segurança do queijo, a contaminação por *S. auerues* ainda é recorrente.

Escherichia coli é um bastonete gram-positivo, anaeróbico facultativo, oxidase negativo, capaz de fermentar a lactose a 45 °C e produzir gás ou ácido (Trmcic, 2016). Este

processo fermentativo pode causar defeitos no queijo, como estufamento precoce (EPAMIG, 2019).

Escherichia coli também é considerado um indicador de falhas de higiene durante a fabricação de alimentos, pois é facilmente eliminado em processos de sanitização. Está presente naturalmente no trato gastrointestinal de animais de sangue quente, e por isso pode contaminar o leite, tanto durante o processo de ordenha, por meio da contaminação fecal, quanto por contaminação cruzada, em qualquer momento através do manipulador. Isso ocorre especialmente em situações de higienização insuficiente de equipamentos, utensílios e mãos (Fda, 2012; Silva *et al.*, 2017).

Allaion, Barrionuevo e Franco (2021) e Campos *et al.* (2021) encontraram elevadas contagens de *E.coli* em amostras de QMA. Além de indicar de falhas de higiene no processo de fabricação, pode haver o risco da presença de enteropatógenos, pois várias cepas de *E. coli* são patogênicas ao homem (Franco; Landgraf, 2008).

Bactérias do gênero *Salmonella* são bacilos retos, gram-negativos, não esporulados, anaeróbicos facultativos. *Salmonella* é uma bactéria que está presente nos locais de produção animal, sendo que a maioria das infecções humanas por *Salmonella* são associadas à ingestão de carne, ovos e produtos lácteos contaminados. Possuem capacidade de crescimento em condições de ampla variação do pH (4,5 a 8,0), baixa atividade de água (até 0,94) e concentrações moderadas de sal (3% a 5%). Por isso, leite e queijos com contaminação têm sido evidenciados como veiculadores de *Salmonella* spp. (Bopp *et al.*, 2003; D'aoust *et al.*, 2001; Borges *et al.*, 2010).

Yamanaka *et al.* (2016) encontraram 6,3% do QMA comercializados em dez regiões metropolitanas brasileiras, contaminados com *Salmonella* spp.. Por outro lado, Resende *et al.* (2011), Santos *et al.* (2017) e Soares *et al.* (2018) não identificaram *Salmonella* spp. em amostras de QMA.

Listeria monocytogenes é uma bactéria que tem ganhado grande destaque entre os patógenos encontrados em queijos. Vários trabalhos já isolaram *L. monocytogenes* de queijos artesanais produzidos em diferentes regiões (Camargo *et al.*, 2020, Allaion; Barrionuevo; Franco *et al.*, 2021). Contudo, estudos também verificaram a redução ou completa inativação de *L. monocytogenes* após o período de maturação, sendo, portanto, importante continuar a investigação dos fatores que interfere no comportamento dos microrganismos em queijos artesanais de diferentes variedades (Campagnollo *et al.*, 2018; Cunha, 2018).

2.3.1 Padrões microbiológicos de queijos fabricados artesanalmente

Diante da recorrente presença de contaminantes patogênicos nos queijos, a implementação de boas práticas durante a ordenha e fabricação do queijo é crucial, para atender os padrões microbiológicos estipulados pela legislação para a produção e comercialização do queijo artesanal (Epamig, 2019).

No que se refere a legislação do queijo Minas Artesanal em vigência, a Instrução Normativa n° 60, de 23 de dezembro de 2019, estabelece as listas de padrões microbiológicos para alimentos prontos para oferta ao consumidor (Brasil, 2019) e o IMA, órgão que fiscaliza as queijarias, dispõe sobre os parâmetros microbiológicos de alimentos de origem animal e água de abastecimento, por meio da publicação da Portaria de n° 2033, de 23 de janeiro de 2021, conforme observados na Tabela 1.

Tabela 1 – Parâmetros microbiológicos do queijo Minas artesanal.

Microbiológico	
Parâmetro	Padrão
Coliformes a 35°C (UFC/g)	n=5; c=2; m=1.000;M=5.000
Coliformes a 45°C (UFC/g)	n=5; c=2; m=100;M=500
<i>Staphylococcus</i> coagulase positiva (UFC/g)	n=5; c=2; m=100;M=1000
<i>Salmonella</i> spp. (/25g)	n=5; c=0; m=0;M=-
<i>Listeria monocytogenes</i> (/25g)	n=5; c=0; m=0;M=-

Fonte: IMA, 2021.

Já para os queijos artesanais das demais variedades, a regulamentação da produção e comercialização dos queijos é realizada por ato normativo específico. A partir da caracterização da região Mantiqueira de Minas, e publicação da Portaria IMA n° 2.049, de 07 de abril de 2021 (Minas Gerais, 2021b), critérios microbiológicos foram definidos para queijo artesanal Mantiqueira de Minas, baseados na Portaria MAPA 146/1996 (Brasil, 1996) apresentados na Tabela 2.

Tabela 2 – Critérios microbiológicos para o queijo Artesanal Mantiqueira de Minas.

Microbiológico	
Parâmetro	Padrão
Coliformes a 35°C (UFC/g)	n=5; c=2; m=200;M=1.000
Coliformes a 45°C (UFC/g)	n=5; c=2; m=100;M=500
<i>Staphylococcus</i> coagulase positiva (UFC/g)	n=5; c=2; m=100;M=1000
<i>Salmonella</i> spp. (/25g)	n=5; c=0; m=0;M=-

Fonte: Portaria MAPA 146/1996.

Apesar das especificidades regionais das variedades dos queijos artesanais de Minas Gerais e, por conseguinte, as normas estabelecidas para sua produção e comercialização, ainda é demandado estudos científicos relacionado ao impacto da maturação sobre a presença de patógenos. Portanto, é importante avaliar como esses microrganismos se desenvolvem e se comportam ao longo do processo de maturação.

2.4 Maturação de queijos artesanais

A maturação é a última etapa no processo de produção do queijo artesanal, onde os principais constituintes do queijo (proteínas, lipídeos e lactose residual) são transformados em compostos com propriedades sensoriais. A maturação também contribui para melhoria da qualidade microbiológica do queijo, uma vez que favorece a combinação de fatores físicos, químicos e microbiológicos considerados fundamentais para a estabilidade e segurança do produto (Alexandre *et al.*, 2002; Viljoen, 2001; Beresford *et al.*, 2001).

A degradação das proteínas ou proteólise, é considerada o principal evento bioquímico que ocorre durante a maturação, e em suma, consiste na quebra das ligações peptídicas das proteínas do leite, por meio de enzimas específicas, proveniente das BAL, microrganismos contaminantes, agente coagulante e proteinases naturalmente presentes no leite. Os compostos resultantes deste processo, como peptídeos, cetonas e aminoácidos livres, irão garantir o sabor, aroma e textura característicos dos queijos (Gutierrez, 2004; Perry, 2004; Mcsweeney, 2004; Lima; Penna, 2012).

Além de alterações sensoriais, a proteólise contribui para a redução da atividade de água dos queijos, decorrente da ligação entre a água livre e os grupos amino produzidos, o que favorece a eliminação de microrganismos indesejáveis, principalmente os patogênicos (Mcsweeney, 2004). A atividade de água também pode ser influenciada pela perda gradativa da umidade, devido a evaporação da água que ocorre afim de manter equilíbrio osmótico, e aumento da concentração sal, que por se ligar a água livre para se dissolver, diminui disponibilidade da água livre (Beresford *et al.*, 2001).

Outro processo bioquímico que ocorre durante a maturação é a lipólise, caracterizada pela hidrólise da gordura, devido a ação de enzimas lipolíticas originadas do próprio leite, microrganismos do fermento ou adicionados durante a fabricação do queijo. Os compostos resultantes são ácidos graxos voláteis de cadeia curta, como capróico, caprílico e cáprico, que irão contribuir principalmente para o aroma típico dos queijos maturados (Cabezas *et al.*, 2005; Fox, 1993; LIMA; Penna, 2012).

Já a lactose residual do queijo fresco, não fermentado pelas BAL iniciadoras, será provavelmente metabolizada pelas BAL não iniciadoras e outros micro-organismos durante a maturação (Fox, 2004). Ao consumir a lactose, as BAL não iniciadoras produzem ácidos orgânicos que conferem o sabor ácido ao queijo, e ainda, podem inibir o crescimento de microrganismos indesejáveis, devido a diminuição do pH, competição por nutrientes e produção de substâncias antimicrobianas, como bacteriocinas (Naidu *et al.*, 1999; Bruno; Carvalho, 2009).

Outras variáveis também afetam diretamente os queijos em maturação, tais como a umidade relativa do ar (controla a desidratação dos queijos), a temperatura (temperaturas elevadas aceleram a maturação) e tempo de cura (definido com base na tecnologia de fabricação de cada variedade). A eficiência do complexo de reações ocorridas, são essenciais para assegurar a segurança microbiológica do queijo, bem como as características do produto (Bank, 1998; Brasil, 2018).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Coleta das amostras

As amostras foram obtidas diretamente de duas queijarias de produção artesanal certificadas pelo IMA. Foram coletados queijos artesanais Mantiqueira de Minas (QAM-M) em setembro de 2022, em Itanhandu, situado na região da Serra da Mantiqueira, e posteriormente, adquiriu-se queijos Minas artesanais (QMA-CV) em fevereiro de 2023, em São João Del Rei, região dos Campos das Vertentes, estado de Minas Gerais, Brasil.

As seis amostras coletadas em cada queijaria, do mesmo lote, logo após a salga, foram transportadas em caixas isotérmicas, contendo gelo reutilizável (4°C a 10°C), para o Laboratório de Microbiologia de Alimentos do Departamento de Ciência dos Alimentos (DCA) da Universidade Federal de Lavras (UFLA).

3.2 Preparo e padronização do inóculo

Para o preparo do inóculo utilizou-se a cepa *Listeria monocytogenes* ATCC 19117, mantida em meio de congelamento (Glicerol - 15 mL; peptona bacteriológica - 2561 0,5 g; extrato de levedura - 0,3 g; NaCl - 0,5 g; água destilada 100 mL), pertencente ao Laboratório de Microbiologia de Alimentos do DCA, UFLA. A cepa foi reativada em caldo triptona de soja acrescido de 0,6% (m/v) de extrato de levedura (TSB-YE) a 37°C por 24 horas.

Os inóculos foram centrifugados à 10000 g por 5 minutos à 4°C, de forma que a células foram ressuspendidas em solução salina 0,85% e padronizadas na escala de McFarland à 0,5 (8 log UFC mL⁻¹). A alta densidade populacional foi inoculada com intuito de acompanhar o decaimento da bactéria ao longo do tempo de maturação.

3.3 Inoculação de *Listeria monocytogenes* no queijo e maturação ex situ

Cada amostra de queijo foi superficialmente marcada em 4 partes iguais (subunidades experimentais), das quais, três foram inoculadas com *L. monocytogenes* em pontos e profundidades aleatórias, com auxílio de ponteiras descartáveis.

Em seguida, as amostras foram acomodadas em sala de maturação sob prateleiras de madeira pinus (140 mm x 400 mm), com temperatura média de 18 - 20°C e umidade entre 60 - 70%, para maturação durante 35 dias. Os queijos foram avaliados no dia seguinte à inoculação (dia 1) e a cada 7 dias (dia 7, 14, 21, 28 e 35). As subunidades experimentais, inoculadas com

L. monocytogenes ou não, foram raladas assepticamente em multiprocessador para realização das análises.

3.4 Quantificação de *Listeria monocytogenes* nos queijos inoculados

De cada subunidade experimental inoculada com *L. monocytogenes*, foram retirados 10 g de amostra para homogeneização em 90 mL de caldo de enriquecimento para *Listeria* Tamponado (BLEB) em Stomacher Metroterm® (490 golpes min⁻¹) por 5 min. As células vegetativas foram quantificadas por plaqueamento em superfície de 100µL das diluições seriadas apropriadas, em meio ágar *Listeria* Oxford acrescido de suplemento, com incubação das placas a 37°C por 48 horas. Após esse período, foi realizada a quantificação de colônias típicas de *L. monocytogenes* (Silva *et al.*, 2017), sendo o resultado expresso em unidades formadoras de colônia por grama (UFC g⁻¹).

3.5 Parâmetros microbiológicos avaliados

Análises microbiológicas foram realizadas em subunidades experimentais não inoculadas, segundo Silva *et al.* (2017).

3.5.1 Quantificação de bactérias lácticas

As subunidades experimentais sem inoculação, foram homogeneizadas em Stomacher Metroterm® (490 golpes min⁻¹) por 5 minutos com 10g de amostra em 90 mL de solução de citrato de sódio à 2% (m v⁻¹). As células vegetativas foram quantificadas por plaqueamento em profundidade de 1 ml das diluições seriadas adequadas em meio ágar MRS (Man, Rogosa e Sharpe) e subsequente incubação das placas à 30°C por 72 horas. Após esse período, realizou-se a contagem de colônias típicas, sendo o resultado expresso em UFC g⁻¹ (Silva *et al.*, 2017).

3.5.2 Quantificação de fungos totais

A contagem total de bolores e leveduras foi quantificada por espalhamento das diluições decimais apropriadas em meio do ágar Dicloran Rosa de Bengala Cloranfenicol (DRBC), por plaqueamento em superfície, com incubação à 25°C por 5 dias. Os resultados foram expressos em UFCg⁻¹.

3.5.3 Quantificação de *Escherichia coli*

A pesquisa de *Escherichia coli* foi determinada utilizando o método de número mais provável (NMP). A contagem foi realizada mediante diluições seriadas adequadas de 1 ml em tubos contendo caldo Lauril Sulfato Triptose (LST), incubados a 37°C por 24 h. Os tubos LST que apresentaram turvação e produção de gás, foram considerados suspeitos para presença de coliformes termotolerantes. Destes tubos, transferiu-se uma alçada da cultura para tubos de caldo *Escherichia coli* (EC) que foram incubados a 45°C por 24 h. A partir dos tubos EC considerados positivos, ou seja aqueles com turvação e produção de gás, retirou-se e estriou-se uma alçada da cultura em placas contendo meio ágar Eosina Azul de etileno (EMB). Após incubação à 37°C por 24 h, colônias típicas foram confirmadas por meio de testes químicos de Citrato e Teste de vermelho de metila (VM) e Voges-Proskauer (VP). Os resultados foram expressos em logaritmo decimal por grama ($\log \text{NMP g}^{-1}$).

3.5.4 Quantificação de *Staphylococcus coagulase positiva*

Para contagem de *Staphylococcus coagulase positiva*, diluições decimais adequadas foram semeadas por plaqueamento em superfície em meio ágar Baird Parker, adicionado de emulsão de gema de ovo e telurito, seguida de incubação a 37°C por 48 h. Colônias típicas e atípicas, foram submetidas a confirmação por meio do teste de coagulase e da catalase. Os resultados foram expressos em $\log \text{UFC g}^{-1}$.

3.5.5 Presença/Ausência de *Salmonella* sp.

A presença/ausência de *Salmonella* sp. foi realizada com pré-enriquecimento, em água peptonada tamponada (ATP) e incubação a 37°C, por 18 h, seguida de enriquecimento seletivo, em caldo Tetrionato e Rapaport & Vassiliadis, incubados a 37°C por 24 h. A partir do enriquecimento seletivo, foram semeadas placas contendo o meio Hektoen, com subsequente incubação a 37°C por 24 h. A confirmação da *Salmonella* foi realizada submetendo as colônias suspeitas a testes bioquímicos em tubos contendo ágar tríplice açúcar ferro inclinado (TSI) e ágar lisina ferro inclinado (LIA) incubados a 37°C por 24 h.

3.5.6 Presença/ausência de *L. monocytogenes*

A detecção de *Listeria monocytogenes* foi realizada com pré-enriquecimento, em caldo Listeria Tamponado (BLEB), seguido da adição de agentes seletivos, após incubação de 30°C por 4 h. Em seguida, alíquotas do enriquecimento foram semeadas por esgotamento em placas com meio ágar Listeria Oxford, acrescido de suplemento, incubadas a 35°C por 48 h. A partir do crescimento obtido, colônias típicas foram submetidas a confirmação por meio dos testes de catalase, coloração de Gram e motilidade em ágar sulfeto indol (25°C por 7 dias).

3.6 Medições de pH e atividade de água

Todas as subunidades experimentais foram submetidas à medição de pH e atividade de água (aw) ao longo de tempo de maturação (Aoac, 2016). Os valores de pH foram mensurados por meio de pHmetro digital (TEC5, Tecnal, Piracicaba, São Paulo, Brasil) e a aw foi medida por meio do analisador Aqua Lab Dew Point Analyzer CX-2 (DecagonDevices Inc., Pullman, WA, EUA) em temperatura ambiente. Os resultados foram expressos como média \pm desvio padrão.

3.7 Análises estatísticas

Para avaliar os resultados quantitativos utilizou-se uma análise estatística descritiva, apresentada por gráficos elaborados por meio do software SciDAVIS®.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Queijo Minas Artesanal do Campos das Vertentes

Os resultados médios obtidos para as medições de pH e atividade de água (a_w), nas amostras do queijo Minas artesanal da região do Campos das Vertentes (QMA - CV) ao longo da maturação, são apresentados na Figura 4.

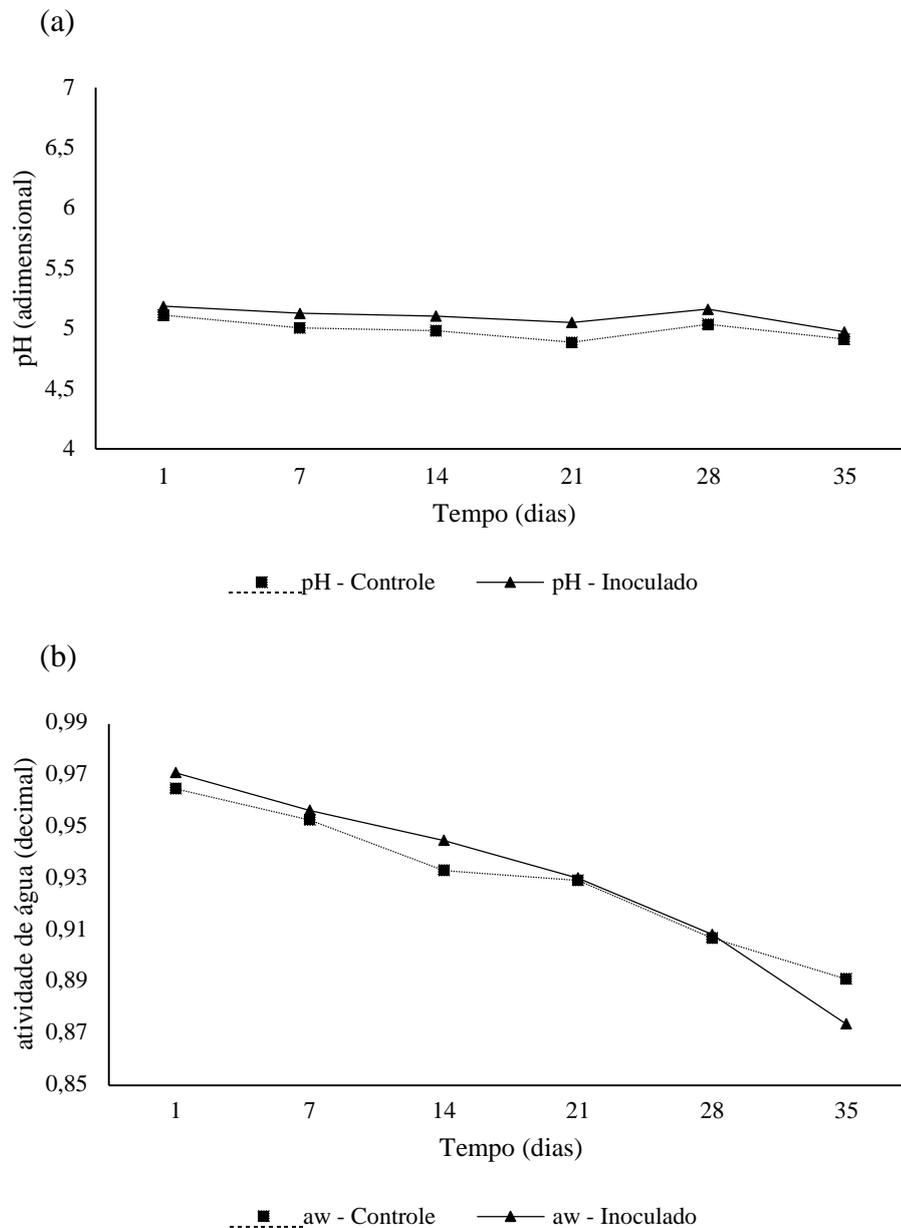
Os valores de pH encontrados nas amostras decresceram ao longo do tempo, variando entre 5,18 a 4,97. A variabilidade do pH nos queijos depende de diversos aspectos, porém, de modo geral, a diminuição gradual do pH ocorre devido a conversão da lactose em ácido lático pela ação de bactérias lácticas provenientes do leite, pingo e queijo durante o processo de maturação (Fernandes, 2018).

Alguns trabalhos também observaram diminuição do pH no decorrer da maturação de queijos artesanais (Santos, 2016; Fernandes, 2018; Rodrigues, 2021). Já em outras pesquisas, observou-se um comportamento diferente a deste estudo (Martins *et al.*, 2015; Figueiredo, 2018). Para estes casos, o aumento dos valores de pH pode ocorrer devido à formação de compostos nitrogenados alcalinos produzidos pelas proteases bacterianas e fúngicas, à medida que a proteólise avança durante a maturação do queijo (Dores *et al.*, 2013; Diezhandino *et al.*, 2015; Martins *et al.*, 2015).

Para a variável a_w , houve uma redução considerável das médias ao longo da maturação. Ao iniciar a maturação, o QMA – CV apresentou valores médios de 0,97 até atingir o valor médio de 0,88, ao final de 35 dias. A redução da atividade de água durante a maturação é esperada, principalmente pela perda gradativa de umidade do queijo, concentração do teor de sal, e hidrólise de proteínas e aminoácidos com cadeias laterais polares ou ionizáveis que interagem com a água livre dos queijos (Beresford *et al.*, 2001).

Os valores médios da a_w do QMA - CV encontrados desde o início da maturação até o 21º dia, se assemelham aos valores observados por Pereira (2019) que estudou os queijos Minas artesanais da região do Campos das Vertentes em condições de temperatura ambiente. Pinheiro (2018), também encontrou valores médios de a_w para o queijo minas artesanal do Serro próximos aos valores observados neste estudo, que variaram entre 0,98 a 0,89, ao longo de 22 dias de maturação armazenados sob temperatura ambiente.

Figura 04 – Valores médios de (a) pH, (b) atividade de água, em QMA - CV inoculados ou não, durante a maturação.



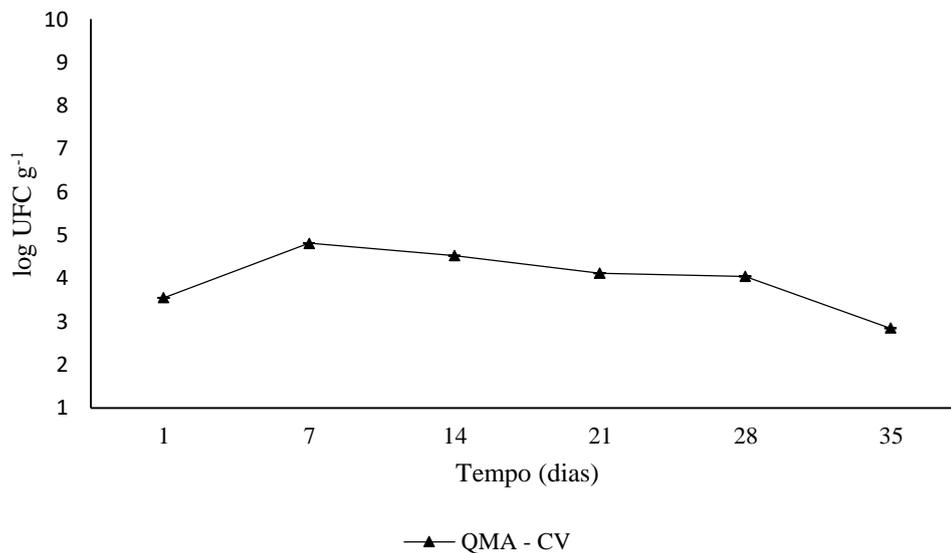
Tanto o pH, como a atividade de água são fatores intrínsecos importantes que afetam a sobrevivência e multiplicação de microrganismos nos alimentos. Em relação ao queijo, a produção de ácido lático com consequente queda de pH, e a diminuição da atividade de água durante a maturação, podem desfavorecer o crescimento microbiano (Cliver; Marth, 1990).

O baixo valor de pH pode atingir intervalos que inibam o metabolismo microbiano, e a forma não dissociada do ácido pode acidificar o meio intracelular e alterar a permeabilidade da membrana, inibindo o transporte ativo (Caplice; Fitzgerald, 1999). Já a baixa atividade de água pode tornar a água disponível insuficiente para o uso das reações metabólicas dos

microrganismos (Jay, 2005). Portanto, é importante frisar que estes parâmetros podem ser determinantes para inibir o desenvolvimento da grande maioria dos patógenos de interesse (Franco; Landgraf, 2005).

De forma geral, as contagens médias de *L. monocytogenes* inoculada em queijo minas artesanal da região do Campo das Vertentes, apresentou redução gradativa ao longo da etapa de maturação, conforme apresentado na Figura 5. Os demais patógenos avaliados na amostra controle, não foram detectados nos queijos durante a maturação.

Figura 5 – Valores médios das contagens de *L. monocytogenes* inoculada no queijo QMA-CV, ao longo da maturação.



A presença de *L. monocytogenes* não foi detectada nas amostras controle no período avaliado. Quanto ao acompanhamento de *L. monocytogenes* inoculada no queijo, observou-se uma contínua redução do seu crescimento ao longo da maturação. A contagem inicial de *L. monocytogenes* no QMA - CV foi de 3,54 log UFC g⁻¹, com aumento nos sete dias seguintes para 4,80 log UFC g⁻¹. Após este período, as contagens médias reduziram até atingir o valor de 2,84 log UFC g⁻¹ ao final de 35 dias de maturação.

A variação observada no início da maturação, entre o 1º e o 7º dia avaliado, pode ser justificada por problemas de representatividade amostral ou pela condição de estresse subletal sofrida pela bactéria após ser inoculada no queijo, visto às diferenças nas características do alimento comparada ao meio de cultura, que anteriormente, fornecia nutrientes essenciais e condições favoráveis ao seu crescimento.

Apesar de perceber-se uma população residual de 2,84 log UFC g⁻¹ da bactéria ao final de 35 dias, houve aproximadamente redução de 1 ciclo log após o período de maturação, considerando a contagem inicial quantificada na massa do queijo. Segundo Cespi *et al.* (2020), a etapa de maturação do queijo é a principal responsável pela redução de contagem das bactérias, devido, dentre outros fatores, à diminuição da atividade de água e do pH.

Morgan *et al.* (2001) também observaram redução de 1 ciclo log em queijos durante 42 dias de maturação, previamente inoculados com *L. monocytogenes* no leite na concentração de 10². Para o autor o decréscimo do crescimento de *L. monocytogenes* relaciona-se com os baixos valores de pH do queijo durante o intervalo de pH correspondente a 4,25 (7 dias de maturação) até 4,97 (28 dias de maturação). Após esse período, a população de *L. monocytogenes* permaneceu a mesma até 42 dias de maturação. No presente trabalho também foi verificado que houve menor desenvolvimento de *L. monocytogenes* enquanto o valor de pH correspondia a 4,97 em 35 dias de maturação.

É bem estabelecido que *L. monocytogenes* cresce idealmente com pH entre 6 e 8, embora possa se adaptar e se desenvolver em pH de até 4,4. Devido à resistência a este e outros fatores relacionados a sua condição fisiológica, *L. monocytogenes* pode permanecer viável em alimentos mesmo sob em condições de estresse (Jay, 2005; Nzfsa, 2002; Cruz *et al.*, 2008b).

A atividade de água com valores maiores ou iguais a 0,97, favorece o crescimento desta bactéria, que ainda possui capacidade de crescer em atividade de água até 0,92, sob condições de pH e temperatura favoráveis (Guahyba Bisneto, 2012). Devido a isso, é possível que a atividade de água de 0,90 e 0,88 em 28 e 35 dias de maturação respectivamente, tenha influenciado a redução de *L. monocytogenes*.

Em pesquisa realizada por Pinheiro (2018) estudando o comportamento de *L. monocytogenes* inoculada na massa do queijo antes da enformagem, verificou-se que a baixa umidade (24,83%) e atividade de água (0,88) estava fortemente relacionada a inativação da bactéria ao longo da maturação ocorrida em temperatura ambiente. Por outro lado, Santos (2016) observou um aumento de 1,16 ciclos log de *L. monocytogenes* acima da contagem inicial no final do período de maturação, apesar do queijo apresentar 25% de umidade, demonstrando a persistência da contaminação do queijo.

Isso confirma a capacidade da bactéria de sobreviver e crescer em diferentes condições, pois a variação na ocorrência de *L. monocytogenes*, em especial de queijos artesanais, implica nas diferentes características típicas da região onde é produzido, no modo de fazer, na composição e qualidade da matéria-prima utilizada, além de outros fatores que alteram a

dinâmica populacional da bactéria, sendo importante estudar o comportamento da bactéria e outros patógenos em queijos de diferentes variedades (Ramos, 2009; Sobral *et al.*, 2022).

Salmonella não foi detectado em amostras controle dos queijos durante a maturação. A ausência de *Salmonella* pode ser admitida por sua baixa incidência no leite, sendo necessário haver contaminação via manipulador, animal doente ou uso de água contaminada (Pinto *et al.*, 2017). Caso a contaminação inicial por *Salmonella* for baixa, esse microrganismo pode não ser detectável em alimentos como queijos artesanais, devido a acidez e competição com outros contaminantes (Silva *et al.*, 1997).

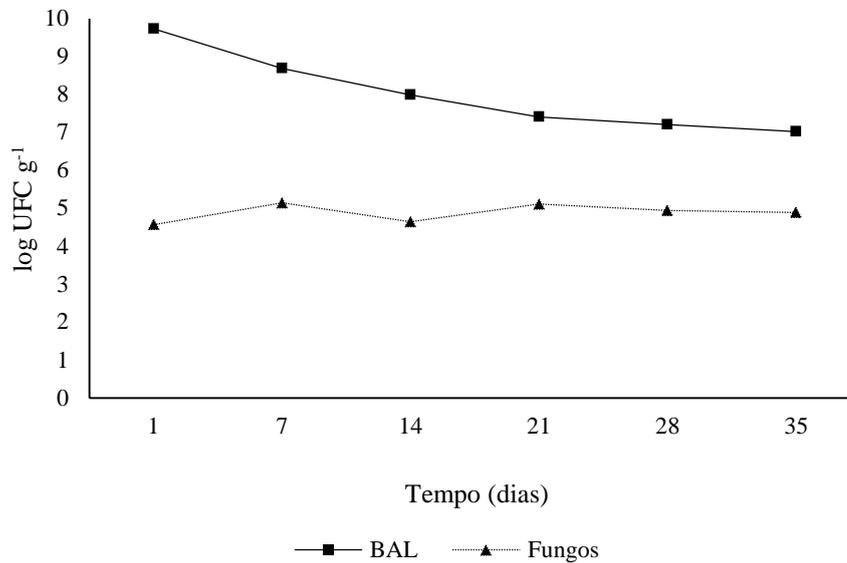
Da mesma forma, não foi detectado a presença de *Staphylococcus* coagulase positiva durante o tempo de maturação e as contagens de *E. coli* estiveram abaixo do limite detectável das amostras controle. A quantificação de *Staphylococcus* coagulase positiva e *E. coli* é importante parâmetro microbiológico usado de referência para a segurança dos alimentos, pois pode indicar condições higiênico-sanitárias durante a produção e conservação (Franco; Landgraf, 1996).

A ausência destes patógenos no queijo Minas artesanal dos Campos das Vertentes, demonstra a importância da adoção de boas práticas de fabricação dos queijos artesanais. Estudo realizado por Sá *et al.* (2021a) avaliou a adoção das boas práticas agropecuárias (BPA) e de fabricação (BPF) do QMA da região do Campo das Vertentes, e concluiu que as cinco queijarias avaliadas, demonstraram buscar se adequar aos quesitos presentes no *checklist* implementado pelo IMA, apresentando percentual médio de 96,5% dos quesitos listados em conformidade.

Segundo Pinto *et al.* (2009) as boas práticas na fabricação de queijo Minas artesanal estão relacionadas a higienização eficiente do ambiente da queijaria, equipamentos e utensílios utilizados; qualidade da água; saúde e hábitos higiênicos dos colaboradores; fabricação do queijo; armazenamento; embalagem; entre outros. A adoção destas medidas minimiza a contaminação e melhora a qualidade dos queijos artesanais produzidos.

Os microrganismos predominantes quantificados na amostra controle dos queijos ao longo da maturação foram as bactérias lácticas e os fungos (Figura 6). De maneira geral, observou-se a redução da microbiota láctica ao longo da maturação, enquanto a contagem de fungos manteve valores próximos durante o período avaliado.

Figura 6 – Valores médios das contagens de bactérias lácticas e fungos presentes nas amostras controle de QMA-CV, ao longo da maturação.



As elevadas contagens bactérias lácticas do QMA, demonstram a alta atividade e viabilidade deste grupo microbiano durante a maturação, sendo obtido inicialmente a contagem de 9,73 log UFC g⁻¹ até atingir ao final de 35 dias o valor 7,02 log UFC g⁻¹.

Resultados semelhantes ao deste trabalho foram encontrados por Pinheiro (2018) que obteve contagens de bactérias lácticas iniciais de 8 log UFC g⁻¹ e ao final de 22 dias as contagens na faixa de 7 log UFC g⁻¹. Castro (2015) quantificou bactérias lácticas em queijos frescos de produtores cadastrados na região dos Campo das Vertentes, com contagens médias entre 7,73 e 8,80 log UFC g⁻¹.

Já a contagem total de fungos quantificada inicialmente no QMA-CV foi de 4,57 log UFC g⁻¹ até obter ao final da maturação a contagem de 4,89 log UFC g⁻¹. Não existe uma regulamentação específica que estabeleça um limite mínimo ou máximo para a presença desses microrganismos em queijos artesanais (Oliveira, 2014).

Contagens elevadas de bolores e leveduras podem ser associadas a presença de bactérias ácido lácticas que, quando em grande proporção, atuam na fermentação da lactose dos queijos, produzindo ácido lático. O ácido lático pode propiciar o desenvolvimento de bolores e leveduras, que são mais resistentes e tolerantes a ambientes ácidos (Leão *et al.*, 2020).

Borelli *et al.* (2006) encontraram em queijo Minas artesanal da Serra da Canastra valores entre 3,39 e 7,89 log UFC g⁻¹ de bolores e leveduras. Já na região do Campo das Vertentes, em queijos Minas Artesanais maturados durante 31 dias, foram encontradas contagens de médias entre 4,77 a 3,06 log UFC g⁻¹ (Sá *et al.*, 2021b).

4.2 Queijo Artesanal Mantiqueira de Minas

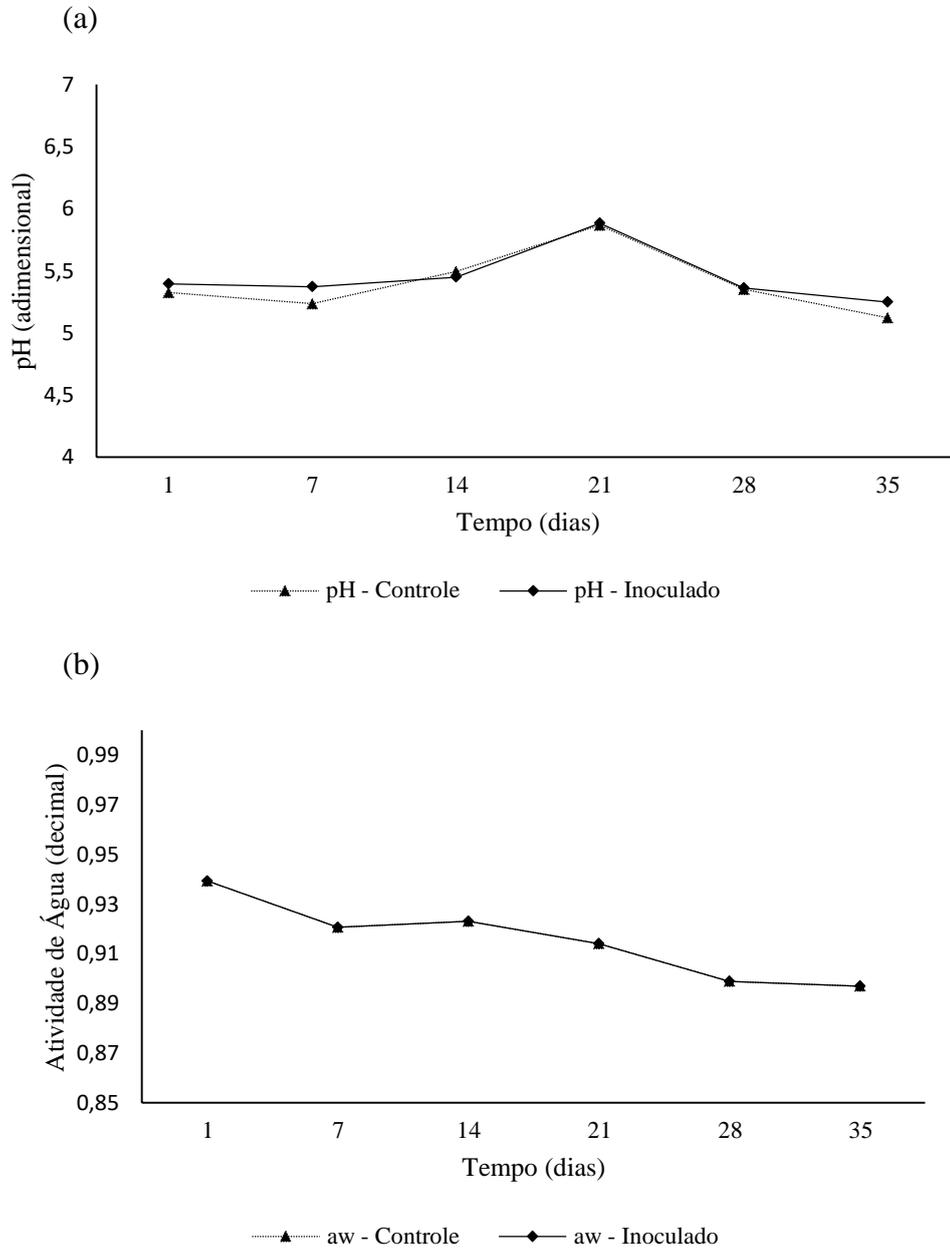
Os resultados médios obtidos para avaliação de pH e atividade de água, nas amostras do queijo artesanal Mantiqueira de Minas (QAM - M) ao longo da maturação, são apresentados na Figura 7.

Os valores médios de pH durante a maturação do QAM -M variaram entre 5,39 e 5,12. Rocha (2021) observou comportamento similar para o pH médio do queijo artesanal da Serra Geral, que variou entre 5,23 a 5,02 ao longo de 21 dias de maturação. Santos Filho *et al.* (2020) encontraram pH médio de 5,14, para o queijo artesanal do Vale do Jequitinhonha (queijo cabacinha). Ambas variedades de queijos, possuem características distintas, devido a especificidades do processo de fabricação, porém, assim como o QAM-M, são produzidos em regiões reconhecidas como tradicionalmente produtoras de queijos artesanais pelo Instituto Mineiro Agropecuário (Minas Gerais, 2018b; Minas Gerais 2014a).

O pH é importante para a identidade e qualidade de todos os queijos. Durante a maturação, as mudanças proteolíticas e microbiológicas, que contribuem para as características únicas do produto, estão fortemente relacionadas a este parâmetro (Lawrence *et al.*, 1983).

A atividade dos fermentos lácticos naturais e à dose utilizada também pode contribuir para alterações no pH, bem como as particularidades do processamento, como o tamanho do grão, o aquecimento da massa e a prensagem mecanizada, que influenciam o pH resultante, devido à menor retenção do teor de lactose. Tais condições podem explicar o pH menos ácido observado para o QAM-M (Fernandes, 2018; Furtado, 2019; Silva *et al.*, 2011b;).

Figura 7 – Medições de (a) pH e (b) atividade de água para amostras QAM-M durante maturação.



Para a variável atividade de água, observou-se redução dos valores médios ao longo da maturação. Inicialmente, a aw apresentou valor de 0,94, até atingir ao final de 35 dias, a média de 0,90. Segundo Esteban e Marcos (1989) a atividade de água é diretamente proporcional ao teor de umidade do queijo e inversamente à concentração de NaCl e outros compostos de baixo peso molecular.

A tecnologia empregada na produção do QAM-M, interfere no teor de umidade do queijo, que conforme Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Queijos, é classificado como um queijo de baixa umidade (Brasil, 1996).

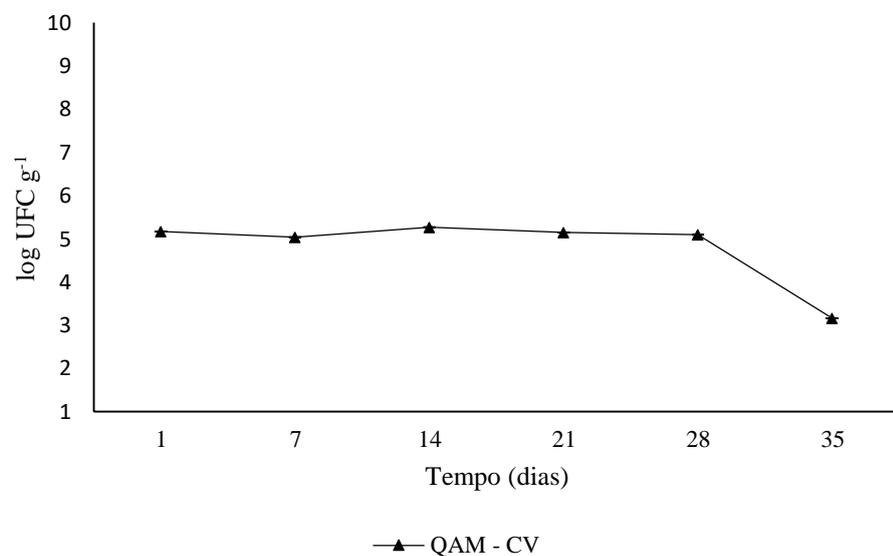
Durante o processo de fabricação, aquecimento da massa é um dos fatores mais importantes no controle da umidade do queijo, por acelerar a expulsão do soro dos grãos. Já a prensagem mecanizada, pode implicar, de acordo com a força exercida, maior compactação no queijo, o que pode reduzir o teor de umidade e, conseqüentemente, a atividade de água (Gomes, 2022; Soares, 2014)

A redução da a_w durante a maturação do queijo ocorre devido à perda de água por evaporação, aumento da concentração de sal e à hidrólise de proteínas em peptídeos e aminoácidos, que requerem para ligação, uma molécula de água (Beresford *et al.*, 2001).

Nascimento (2023) observou que a a_w em queijo Minas artesanal da região do Campos das Vertentes prensados em prensa inox apresentou médias entre 0,95 a 0,90 ao longo de 30 dias de maturação. Ferraz (2016) obteve valores de a_w de queijos Minas artesanais da Canastra próximos aos encontrados para o QAM - M ao longo de 28 dias de maturação e assim como neste trabalho, o autor estudou queijos maturados fora da propriedade de origem.

A etapa de maturação foi eficiente na redução de patógenos do QAM-M. Os resultados médios obtidos para *L. monocytogenes* inoculada no queijo, e demais patógenos quantificados na amostra controle, podem ser observados na Figura 8.

Figura 8 – Valores médios das contagens de *L. monocytogenes* inoculada no queijo QMA-CV, ao longo da maturação.



Nas amostras controle analisadas não foi detectado *L. monocytogenes*. Vários trabalhos demonstraram a baixa incidência de *L. monocytogenes* em queijos artesanais (Camargo *et al.*, 2020, Allaion; Barrionuevo; Franco *et al.*, 2021), o que evidencia a boa qualidade microbiológica dos queijos.

Quanto as amostras inoculadas com o patógeno, observou-se uma redução gradativa, com médias que variaram entre 5,16 log UFC g⁻¹ até a faixa de 3,15 log UFC g⁻¹ ao final de 35 dias. Châtelard-chauvin *et al.* (2015) ao estudarem a maturação de queijos do tipo Cantal, inoculado com concentrações de 6 log UFC g⁻¹ de *L. monocytogenes* no leite, observaram contagens constantes entre 3 e 3,5 log UFC g⁻¹ durante 45 dias de maturação. A diminuição da população de *L. monocytogenes* após o período completo da maturação (360 dias), foi atribuído pelos autores à baixa atividade de água, uso de embalagem (papel kraft) e o longo tempo de maturação.

Pinto (2008) e Siciliano *et al.* (2019) utilizaram *L. innocua* como organismo modelo para avaliar o comportamento de *L. monocytogenes* ao longo da maturação de queijos produzidos com leite cru. Pinto (2008) verificou reduções de 1,66 ciclos log na contagem de *L. innocua* inoculada no leite na concentração de 10³, durante 60 dias de maturação, em queijo Minas artesanal do Serro. Siciliano *et al.* (2019), observaram redução de aproximadamente 1,5 ciclos log no crescimento de *L. innocua*, ao longo de 21 dias, para queijo elaborado em laboratório com adição de fermento endógeno da Serra da Canastra.

Em ambos os casos, os autores indicaram que a redução de *L. innocua* estava relacionado a fatores intrínsecos do queijo, que com o decorrer da maturação, condicionava o meio à diminuição do pH, a baixa atividade de água e a alta atividade de bactérias lácticas. Da mesma forma, neste trabalho, a redução de 2 ciclos log durante o período avaliado, indica que a maturação influenciou o decaimento de *L. monocytogenes* no queijo, especialmente devido a redução da atividade de água, que atingiu o limite mínimo tolerado pela bactéria.

A pesquisa de *Salmonella* em amostras controle não detectou a presença do patógeno ao longo da maturação. A baixa incidência ou ausência de *Salmonella* spp. têm sido observada em diferentes estudos realizados em queijos artesanais produzidos em Minas Gerais, apesar do uso do leite cru (Campos, 2019; Meier *et al.*, 2021; Soares *et al.*, 2018). Presume-se que isto esteja relacionado a presença do patógeno em quantidades baixas ou indetectáveis, ou a competição com outros microrganismos (Resende *et al.*, 2011).

Quanto a quantificação de *Staphylococcus* coagulase positiva, foi observado inicialmente elevadas contagens com média de 5,63 log UFC g⁻¹, que sob efeito do tempo de maturação, reduziu a partir de 14 dias, até completa inativação ao atingir 28 dias de maturação.

Do mesmo modo, houve redução das contagens iniciais de *E. coli* de 3,96 log NMP g⁻¹ a 1,55 log NPM g⁻¹ até o final de 35 dias de maturação.

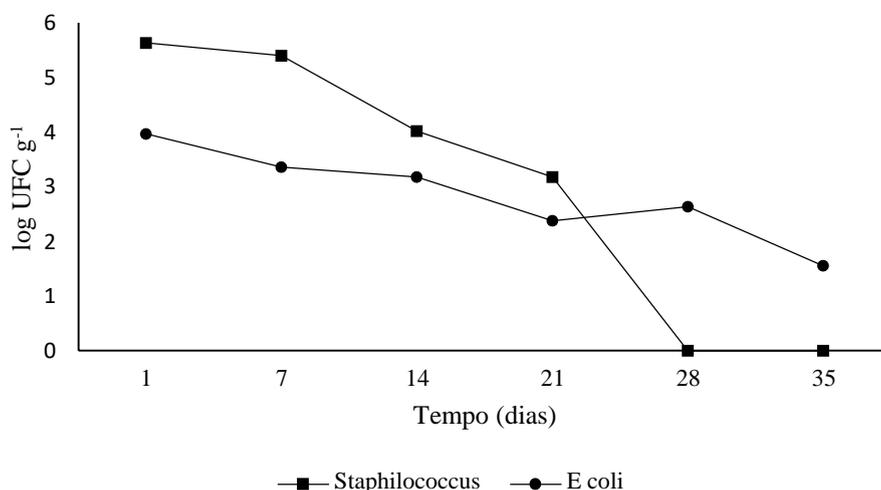
Dores *et al.* (2013) também observaram a redução da população de *E.coli* e *S.aureus* em estudo realizado durante 22 dias de maturação de queijos da Canastra a temperatura ambiente. Ferraz (2016) encontrou inicialmente contagens de 5,4 log UFC g⁻¹ de *Staphylococcus* coagulase positiva em queijos da Serra da Canastra, que em 14 dias maturados em centro de maturação se adequaram aos limites máximos indicados como seguros. Já Santos (2016) relatou a diminuição de *E. coli* em 60 dias de maturação, porém o valor residual da bactéria encontrado de 2,3 log UFC g⁻¹ foi maior do que obtido neste trabalho.

Segundo Vasconcelos (2010) durante a maturação, muitos são os fatores que limitam o crescimento de microrganismos indesejáveis no queijo, como potencial redox, atividade de água e pH. Além da influência do processo de maturação sobre o desenvolvimento de patógenos em queijos artesanais, há estudos que sugerem que a presença de bactérias ácido lácticas, tem efeito benéfico de reduzir e/ou inibir do crescimento de *E. coli* e *Staphylococcus* spp. (Pretto *et al.*, 2021; Leão *et al.*, 2020).

Assim, as bactérias ácido lácticas podem ser consideradas importantes tanto para assegurar a qualidade microbiológica do queijo, por atuar com antagonismo bacteriano, quanto por contribuir no desenvolvimento do aroma e textura do produto final (Rafael, 2017).

Altas contagens de bactérias lácticas e fungos ao longo da maturação foram quantificados no QAM-M, conforme apresentado na Figura 9. Para a microbiota láctica, foi obtido inicialmente a contagem de 9,73 log UFC g⁻¹ até atingir ao final de 35 dias o valor de 6,88 log UFC g⁻¹.

Figura 9 – Valores médios da contagem de *Staphylococcus* coagulase positiva e *Escherichia coli* durante a maturação do QAM-M.



Gomes (2022) estudando QMA da região do Campo das Vertentes prensados a mão e na prensa encontrou médias de 8,61 log UFC g⁻¹ e 8,86 log UFC g⁻¹, respectivamente. Na região da Serra do Salitre, Figueiredo (2018) encontrou contagens de BAL variando entre 7,74 e 6,34 log UFC g⁻¹ ao longo de 63 dias de maturação. Leão *et al.* (2020) observaram que as contagens de bactérias ácido-láticas mantiveram-se constantes durante todo o tempo de maturação do queijo Minas artesanal do Campo das Vertentes, apresentando contagens médias de 7 log UFC g⁻¹.

Como mencionado anteriormente, a existência de elevadas concentrações de bactérias ácido-láticas, contribui para que essas bactérias possam atuar como inibidoras de microrganismos indesejáveis, criando um ambiente seletivo que paralelamente beneficia o desenvolvimento de microrganismos de interesse.

As bactérias láticas se relacionam diretamente com a segurança microbiológica dos queijos, pois durante a maturação, são responsáveis pela produção de bacteriocinas e diversos subprodutos do seu metabolismo que inibem microrganismos deteriorantes e patogênicos (Gomes, 2022). Alguns trabalhos já isolaram bactérias láticas com potencial atividade antagonista contra *L. monocytogenes*, e comprovaram que sua ação constitui uma barreira adicional ao crescimento de patógenos durante a maturação (Ortolani *et al.*, 2010; Campagnollo *et al.*, 2018b).

A contagem total de fungos ao longo da maturação, variou entre 4,32 log UFC g⁻¹ e 5,51 log UFC g⁻¹. Lima *et al.* (2009), avaliando amostras de queijo Minas artesanal produzido no município de Serra do Salitre (Minas Gerais), observaram contagens destes microrganismos variando entre 2 e 6 log UFC g⁻¹. Estudos realizados por Leão *et al.* (2020), constataram que a contagem total de bolores e leveduras nos queijos ao longo do período de maturação, estiveram na faixa de 6 a 7 log UFC g⁻¹. Oliveira (2014), obteve valores médios entre 4,1 a 6,4 log UFC g⁻¹ para o QMA do Campo das Vertentes.

Ainda que em quantidades baixas, é comum a presença destes microrganismos no leite cru e pingos utilizados na fabricação do queijo. Outra possível fonte de contaminação é o ambiente de fabricação ou maturação do queijo (Oliveira, 2014; Epamig, 2019).

Em algumas variedades de queijos, os fungos são fundamentais para o desenvolvimento de aromas e sabores únicos após a maturação. Para outros casos, elevadas contagens podem ser indicativo de contaminação e levar a deterioração do produto. De qualquer modo, a aplicação de Boas Práticas de Fabricação (BPF) e de ordenha são ainda as principais medidas preventivas importantes para evitar o crescimento de fungos não desejáveis no queijo, e assim precaver

alterações no sabor e no aspecto visual do queijo, como aparecimento de manchas internas ou na casca (Leão *et al.*, 2020; Epamig, 2019).

5 CONCLUSÃO

Nas condições investigadas neste estudo, pode inferir-se que o processo de maturação influenciou a diminuição do crescimento de *Listeria monocytogenes* inoculado na massa do queijo recém fabricado de ambas variedades ao longo do tempo.

De maneira geral, a redução do pH, e especialmente da atividade de água, ao longo da maturação, podem ter influenciado o comportamento de *L. monocytogenes* inoculada nos queijos, devido aos valores observados estarem próximos do limite mínimo tolerado pela bactéria.

A etapa de maturação, ao final do período avaliado, foi eficiente para reduzir a níveis seguros contaminantes como *Staphylococcus* coagulase positiva e *E. coli*, quando presentes em amostras controle. Outros patógenos avaliados, como *Salmonella* e *L. monocytogenes*, não foram identificados em ambas variedades dos queijos nas amostras não inoculadas.

Portanto, a maturação, bem como a implementação das boas práticas de fabricação influenciaram na qualidade microbiológica dos queijos, o que demonstra a eficiência do processo e a importância da adoção de medidas que promovam condições higiênicas-sanitárias satisfatórias nas queijarias. Sugere-se que mais estudos se dediquem a entender o comportamento de patógenos no queijo associado a avaliação de outros fatores que interagem com os complexos fenômenos, que envolvem a maturação.

REFERÊNCIAS

- ALEXANDRE, D. P. *et al.* Atividade antimicrobiana de bactérias lácticas isoladas de queijo-de-Minas artesanal do Serro (MG) frente a microrganismos indicadores. **Arquivos Brasileiros de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 54, n. 4, p. 424-428, 2002.
- ALLAION, J. R.; BARRIONUEVO, K. G.; FRANCO, B. D. G. M. Assessing the microbiological safety parameters of minas artesanal cheese samples in retail environments in São Paulo, Brazil. **Applied Sciences**, v. 11, n. 19, p. 9331, 2021.
- ANDRETTA, M. *et al.* Microbial safety status of Serro artisanal cheese produced in Brazil. **Journal of dairy science**, v. 102, n. 12, p. 10790-10798, 2019.
- AOAC. Association of Official Analytical Chemists. **Official Methods of Analysis of AOAC International**, 20th Edition, Gaithersburg, 2016.
- ARAÚJO, J. P. A. *et al.* Uma análise histórico-crítica sobre o desenvolvimento das normas brasileiras relacionadas a queijos artesanais. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 72, n. 5, p. 1845-1860, 2020.
- BAIRD-PARKER, A.C. The staphylococci “an introduction”. **Journal of Applied Bacteriology**, p.1-8, 1990.
- BANK, J. M. Cheese. In: EARLY, R. **The Technology of Dairy Products**. 2.ed. London. Ralph EARLY, 1998. Cap.3, p.81-122.
- BARANCELLI, G. V. *et al.* *Listeria monocytogenes*: ocorrência em produtos lácteos e suas implicações em saúde pública. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 78, p. 155-168, 2011.
- BERESFORD, T. P. *et al.* Recent advances in cheese microbiology. **International Dairy Journal**, v. 11, n. 4-7, p. 259-274, 2001.
- BEZERRA, K. F. **Focus group na avaliação da percepção do consumidor sobre queijo Minas artesanal**. 2018. Dissertação. (Mestrado em Ciência Animal) – Universidade Federal de Minas Gerais, Montes Claros, 2018.
- BOPP, A. C.; BRENNER, F. W.; FIELDS, P. I.; WELLS, J. G.; STROCKBINE, N. A. *Escherichia coli*, *Shigella*, and *Salmonella*. In: MURRAY, P. R.; BARON, E. J.; JORGENSEN, J. H.; PFALLER, M. A.; YOLKEN, R. H. (Ed.). **Manual of clinical microbiology**. 8. ed. Washington D. C.: ASM, 2003. v. 1, cap. 42, p. 654-671.
- BORELLI, B. M. *et al.* Yeast populations associated with the artisanal cheese produced in the region of Serra da Canastra, Brazil. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 22, n. 11, p. 1115-1119, 2006.
- BORGES, M. F.; ANDRADE, A. P. C.; MACHADO, T. F. **Salmonelose Associada ao Consumo de Leite e Produtos Lácteos**. Fortaleza: Embrapa Agroindústria Tropical, 2010. 26 p.

BRASIL. Agência Nacional De Vigilância Sanitária. **Instrução normativa nº 60 de 23 de dezembro de 2019**. Disponível em: <<https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/inspecao/produtos-vegetal/legislacao-1/biblioteca-de-normas-vinhos-e-bebidas/instrucao-normativa-ndeg-60-de-23-de-dezembro-de-2019.pdf/view>>. Acesso em: 04 abr. 2023.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Lei nº 13.680, de 14 de junho de 2018. Altera a Lei nº 1.283, de 18 de dezembro de 1950, para dispor sobre o **Processo de Fiscalização de Produtos Alimentícios de Origem Animal Produzidos de Forma Artesanal**. Brasília: Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, 2018.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Portaria nº 146, de 07 de março de 1996. **Regulamentos Técnicos de Identidade e Qualidade dos Produtos Lácteos**. Brasília: Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, 1996.

BRASIL. Ministério da Cultura. Instituto do Patrimônio Histórico e Artístico Nacional. **Titulação**. Confere o Título de Patrimônio Cultural do Brasil ao Modo Artesanal de Fazer Queijo de Minas, nas regiões do Serro, da Serra da Canastra e Salitre/Alto Paranaíba. 2008. Disponível em: http://portal.iphan.gov.br/uploads/ckfinder/arquivos/Modo_fazer_queijo_minas_titulacao.pdf. Acesso em: 30 jun. 2023.

BRUNO, L. M.; CARVALHO, J. D. G. Microbiota láctica de queijos artesanais. **Embrapa Agroindústria Tropical-Documentos**, 2009.

CABEZAS, L. *et al.* Physicochemical and sensory characteristics of Spanish goat cheeses. **Milchwissenschaft**, v. 60, p. 48-55, 2005.

CAMARGO, A. C. *et al.* Microbiological quality and safety of Brazilian artisanal cheeses. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 52, n. 1, p. 393-409, 2021.

CAMPAGNOLLO, F. B. *et al.* Quantitative risk assessment of *Listeria monocytogenes* in traditional Minas cheeses: The cases of artisanal semi-hard and fresh soft cheeses. **Food control**, v. 92, p. 370-379, 2018a.

CAMPAGNOLLO, F. B. *et al.* Selection of indigenous lactic acid bacteria presenting anti-listerial activity, and their role in reducing the maturation period and assuring the safety of traditional Brazilian cheeses. **Food Microbiology**, v. 73, p. 288-297, 2018b.

CAMPOS, G. Z. **Avaliação Microbiológica de Queijos Minas Artesanais Provenientes da Serra da Canastra Durante e Após o Período de Maturação**. 2019. Dissertação (Mestrado em Ciência dos Alimentos) – Universidade de São Paulo, São Paulo, 2019.

CAMPOS, G. Z. *et al.* Microbiological characteristics of Canastra cheese during manufacturing and ripening. **Food Control**, v. 121, p. 107598, 2021.

CAPLICE, E.; FITZGERALD, G.F. Food fermentations: role of microorganisms in food production and preservation. **International Journal Food Microbiology**, v.50, n. 1-2, p.131-149, 1999.

- CASTRO, R. D. **Queijo minas artesanal fresco de produtores não cadastrados da mesorregião de campo das vertentes – MG: qualidade microbiológica e físico-química em diferentes épocas do ano.** 2015. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2015.
- CESPI, B. A. ; OLIVEIRA, R.; KUNIGK, C. J. Modelagem do comportamento de *Listeria Innocua* durante a produção de queijo artesanal. Disponível em <https://maua.br/files/122019/avaliacao-do-crescimento-listeria-innocua-queijo-artesanal-261139.pdf>. Acesso em 10 de abril, 2023.
- CHATELARD-CHAUVIN, C. *et al.* Behaviour of *Listeria monocytogenes* in raw milk Cantal type cheeses during cheese making, ripening and storage in different packaging conditions. **Food Control**, v. 54, p. 53-65, 2015.
- CLIVER, D.O., MARTH, E.H. Preservation, sanitation and microbiological specifications for food. In: CLIVER D.O. (Ed). Foodborne disease, Califórnia: Academic Press, 1990. P.85-106.
- COLAGIORGI, A. *et al.* *Listeria monocytogenes* biofilms in the wonderland of food industry. **Pathogens**, v. 6, n. 3, p. 41, 2017.
- CRUZ, C. D. *et al.* Epidemiological survey of *Listeria monocytogenes* in a gravlax salmon processing line. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 39, p. 375-383, 2008b.
- CRUZ, C. D.; MARTINEZ, M. B.; DESTRO, M. T. *Listeria monocytogenes*: Um agente infeccioso ainda pouco conhecido no Brasil. **Alimentos e Nutrição**, v.19, n.2, p.195-206, 2008a.
- CUNHA, A. L. F. S. **Potencial probiótico in vitro de *Lactobacillus* spp. isolados de queijo Minas artesanal da Serra do Salitre – MG.** 2018. Dissertação (Mestrado em Produção Animal) – Universidade Federal de Minas Gerais, Montes Claros, 2018.
- D’Aoust, J. Y.; MAURER, J.; BAILEY, J. S. Salmonella species. In: DOYLE, M. P.; BEUCHAT, L. R.; MONTVILLE, T. J. (Ed.) **Food microbiology, fundamentals and frontiers**. 2. ed. Washington: ASM, 2001. Cap. 18, p. 383-409.
- DIEZHANDINO I. *et al.* Microbiological, physico-chemical and proteolytic changes in a Spanish blue cheese during ripening (Valdeón cheese). **Food Chemistry**, v. 168, p. 134-141, 2015.
- DONNELLY, C. W. *Listeria monocytogenes*: a continuing challenge. **Nutrition reviews**, v. 59, n. 6, p. 183-194, 2001.
- DORES, M. T.; NOBREGA, J. E.; FERREIRA, C. L. L. F. Room temperature aging to guarantee microbiological safety of Brazilian artisan Canastra cheese. **Food Science and Technology**, v. 33, n. 1, p. 180-185, 2013.
- EMATER – Empresa de Assistência Técnica e Extensão Rural do Estado de Minas Gerais. Belo Horizonte, 2021. **Comunicação pessoal. Mapa do queijo Minas artesanal.** Disponível em: www.emater.mg.gov.br. Acesso em: 10 fev. 2021b.

EMATER – Empresa de Assistência Técnica e Extensão Rural do Estado de Minas Gerais. **Caracterização integrada de municípios na região da Mantiqueira como produtores de queijo artesanal.** Belo Horizonte: Emater, 2019b. 132 p.

EMATER. Empresa de Assistência Técnica e Extensão Rural de Minas Gerais. **Cartilha de boas práticas agropecuárias na produção de leite para a fabricação de queijo artesanal serrano.** [Elaborada por] Jaime Eduardo Ries, Saionara Araújo Wagner e Izadora Bottega. Porto Alegre: Emater/RS-Ascar, 2019a. 48 p.

EMATER. Empresa de Assistência Técnica e Extensão Rural de Minas Gerais. **Levantamento da Emater-mg mostra que minas gerais tem 32 mil agroindústrias familiares.** 2021a. Disponível em: https://www.emater.mg.gov.br/portal.do/site-noticias/levantamento-da-emater-mg-mostra-que-minas-gerais-tem-32-mil-agroindustrias-familiares/?flagweb=novosite_pagina_interna_noticia&id=26273. Acesso em: 10 jun. 2023.

EMBRAPA. **Queijo Minas Artesanal: Valorizando a Agroindústria Familiar.** Brasília, DF, 2018. 23 ed. 102 p.

EMPRESA DE ASSISTÊNCIA TÉCNICA E EXTENSÃO RURAL DE MINAS GERAIS. **Caracterização da microrregião de Campos das Vertentes como produtora tradicional de queijo minas artesanal.** Belo Horizonte, 2009.

EPAMIG. **Queijo Minas Artesanal Principais problemas de Fabricação – Manual Técnico de Orientação ao Produtor.** Belo Horizonte: EPAMIG, 2019. 40 p.

ESTEBAN, M. A; MARCOS, A. A determinacion de la actividad del agua em el control de calidad de alimentos d humedad intermedia y alta. **Alimentaria**, n. 203, p. 27-31, 1989.

FDA, Food and Drug Administration. **Center for Food Safety & Applied Nutrition.** Foodborne Pathogenic Microorganisms and Natural Toxins Handbook “Bad Bug Book”. 2 ed. 2012. Disponível em :<<https://www.fda.gov/food/foodborne-pathogens/bad-bug-book-second-edition>> Acesso em: 08 jun. 2023

FERNANDES, L.V. **Desenvolvimento de tecnologia de queijo tipo minas artesanal da Microrregião do Campo das Vertentes para produção industrial com emprego de leite pasteurizado.** Dissertação de mestrado. Universidade Federal de Juiz de fora, Juiz de Fora. 2018.

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

FIGUEIREDO, L. V. **Maturação e características de qualidade do queijos Minas Artesanal do Serro.** 2018. Dissertação (Mestrado em Zootecnia)-Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e do Mucuri, Diamantina, 2018.

FOX, P. F. **Cheese: chemistry, physics and microbiology.** Vol 1 – General aspects. London U. K. 1993. A. Chapman & Hall, 2. Ed. 601 p. 1993.

FOX, P. F. *et al.* Cheese: An Overview. In: ---, **Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology**. 3 ed., Elsevier Academic Press. Vol. 1, pp. 1-2. London. 2004.

FRANCO, B. D. G. M.; LANDGRAF, M **Crítérios microbiológicos para avaliação da qualidade dos alimentos**. São Paulo: Atheneu, 1996. 182 p.

FRANCO, B. D. G. M.; LANDGRAF, M. **Microbiologia dos Alimentos**. São Paulo: Atheneu, 2005. 182p.

FRYE, D. M. *et al.* An outbreak of febrile gastroenteritis associated with delicatessen meat contaminated with *Listeria monocytogenes*. **Clinical infectious diseases**, v. 35, n. 8, p. 943-949, 2002.

FURTADO, M. M. **Queijos semiduros**. São Paulo: Setembro editora, 2019.

GARRIDO, V.; GARCÍA-JALÓN, I.; VITAS, A. I. Temperature distribution in Spanish domestic refrigerators and its effect on *Listeria monocytogenes* growth in sliced ready-to-eat ham. **Food Control**, v. 21, n. 6, p. 896-901, 2010.

GÉRARD, A. *et al.* Study of the microbial diversity of a panel of Belgian artisanal cheeses associated with challenge studies for *Listeria monocytogenes*. **Food Microbiology**, v. 100, p. 103861, 2021.

GOMES, M. S. **Avaliação de queijos minas artesanais da região de campo das vertentes fabricados com prensagens manual e mecânica**. 2022. Dissertação. (Mestrado em Ciência e Tecnologia do Leite e Derivados) – Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora, 2022.

GOULET, V. *et al.* What is the incubation period for listeriosis? **BMC infectious diseases**, v. 13, n. 1, p. 1-7, 2013.

GUAHYBA BISNETO, J. P. ***Listeria monocytogenes*: um perigo presente nos alimentos**. Trabalho de conclusão de curso de Medicina Veterinária. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2012.

GUTIERREZ, E. M. R. *et al.* Efeito da radiação gama nas características físico-químicas e microbiológicas do queijo prato durante a maturação. **Food Science and Technology**, v. 24, p. 596-601, 2004.

HALBEDEL, S. *et al.* Large nationwide outbreak of invasive listeriosis associated with blood sausage, Germany, 2018–2019. **Emerging infectious diseases**, v. 26, n. 7, p. 1456, 2019.

IMA, Instituto Mineiro de Agropecuária. **Regiões produtoras de queijo Minas artesanal**, 2021a. Disponível em: <<http://www.ima.mg.gov.br/certificacao/queijo-minas-artesanal>>. Acesso em 10 dez. 2022.

IMA, Instituto Mineiro de Agropecuária artesanal. **Lista de produtores cadastrados no programa de queijo Minas Artesanal, 2021b**. Disponível em: <<file:///C:/Users/Usu%C3%A1rio/Downloads/produtores-qma-15-10-2018.pdf>> Acesso em 07 out. 2022.

- JARAMILLO-BEDOYA, E.; TRUJILLO-ALZATE, Y. A.; OCAMPO-IBÁÑEZ, I. D. Surveillance of Fresh Artisanal Cheeses Revealed High Levels of *Listeria monocytogenes* Contamination in the Department of Quindío, Colombia. **Pathogens**, v. 10, n. 10, p. 1341, 2021.
- JAY, J. M. Prevalence of *Listeria* spp. in meat and poultry products. **Food Control**, v. 7, n. 4/5, p. 209-214, 1996.
- JAY, J. M. **Microbiologia de alimentos**. 6. ed. Porto Alegre: Artmed, 711 p, 2005.
- JEMMI, T.; STEPHAN, R. *Listeria monocytogenes*: food-borne pathogen and hygiene indicator. **Revue Scientifique et Technique**, v. 25, n. 2, p. 571-80, 2006.
- KALLIPOLITIS, B.; GAHAN, C. G. M.; PIVETEAU, P. Factors contributing to *Listeria monocytogenes* transmission and impact on food safety. **Current Opinion in Food Science**, v. 36, p. 9-17, 2020.
- KAMIMURA, B. A. *et al.* Brazilian Artisanal Cheeses: An Overview of their Characteristics, Main Types and Regulatory Aspects. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v.18, p.1636-1657, 2019.
- LAWRENCE, R. C.; GILLES, J.; CREAMER, L. K. The relationship between cheese texture and flavour. **New Zealand Journal of Dairy Science and Technology**, v. 18, p. 175-190, 1983.
- LEÃO, G. S. *et al.* Influência da aplicação de revestimento comestível em Queijo Minas Artesanal durante o período de maturação. **HOLOS**, v. 2, p. 1-20, 2020.
- LI, C. *et al.* Perinatal listeriosis patients treated at a maternity hospital in Beijing, China, from 2013–2018. **BMC Infectious Diseases**, v. 20, n. 1, p. 1-9, 2020.
- LIMA, M. S.; PENNA, L. P. C. **Fabricação de produtos lácteos: princípios básicos**. Belo Horizonte: Emater-MG, 2012, 68p.
- LIMA, C. D. L. C. *et al.* Bactérias do ácido láctico e leveduras associadas com o queijo-de-Minas artesanal produzido na região da Serra do Salitre, Minas Gerais. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 61, n. 1, p. 266-272, 2009.
- MARTINS, J. M. *et al.* Determining the minimum ripening time of artisanal Minas cheese, a traditional Brazilian cheese. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 46, n. 1, p. 219-230, 2015.
- MONTVILLE, T. J.; MATHEWS, K. R. **Food Microbiology: An Introduction**. 2nd Ed. Washington, D.C.: ASM Press, 2008. 428 p.
- MCLAUCHLIN, J. *et al.* *Listeria monocytogenes* and listeriosis: a review of hazard characterization for use in microbiological risk assessment of foods. **International Journal of Food Microbiology**, v. 92, n. 1, p. 15-33, 2004.

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

MEIER, G. O. S. *et al.* Avaliação da qualidade microbiológica e físico-química de queijos maturados produzidos com leite cru. **Revista Científica do UBM**, p. 180-192, 2021.

MENESES, J. N. C. **Queijo Artesanal de Minas**: patrimônio cultural do Brasil. 2006, 156 p.

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

MINAS GERAIS. Instituto Mineiro de Agropecuária. Portaria nº 2049, de 07 de abril de 2021. **Estabelece o regulamento técnico de identidade e qualidade do queijo artesanal Mantiqueira de Minas**. Diário Oficial do Estado de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, 07 abr. 2021b.

MINAS GERAIS. Lei nº20.549, de 18 de dezembro de 2012. **Dispõe sobre a produção e a comercialização dos queijos artesanais de Minas Gerais**. Belo Horizonte, 18 de dezembro de 2012.

MINAS GERAIS. Instituto Mineiro de Agropecuária. Portaria nº 1986, de 16 de junho de 2020. **Identifica a região de Alagoa como produtor do Queijo Artesanal de Alagoa**. Diário Oficial do Estado de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, 16 de junho de 2020b.

MINAS GERAIS. Instituto Mineiro de Agropecuária. Portaria nº 1825, de 19 de junho 2018. **Identifica a região da Serra Geral do Norte de Minas como produtora de queijo artesanal**. Diário Oficial do Estado de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, 19 de junho de 2018b

MINAS GERAIS. Instituto Mineiro de Agropecuária. Portaria nº 1403, de 02 de maio 2014. **Identifica a região do Vale do Jequitinhonha como produtora de queijo cabacinha**. Diário Oficial do Estado de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, 10 de maio de 2014a.

MINAS GERAIS. Instituto Mineiro Agropecuário. Portaria nº 1427, de 29 de agosto de 2014. **Identifica a região do Vale do Suaçuí como produtora de Parmesão de Modo Artesanal**. Diário Oficial do Estado de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, 29 de agosto de 2014b.

MINAS GERAIS. Lei Nº 23157 DE 18/12/2018 - Estadual - Minas Gerais. **Dispõe sobre a produção e a comercialização dos queijos artesanais de Minas Gerais**. Belo Horizonte, DOE - MG em 19 de dezembro de 2018a. Disponível em:
<<https://www.legisweb.com.br/legislacao/?id=372516>>. Acesso em 15 de jun. 2022.

MINAS GERAIS. Instituto Mineiro de Agropecuária. Portaria nº 1022, de 03 de novembro de 2009. Identifica a Microrregião do Campo das Vertentes. Diário Oficial do Estado de Minas Gerais, Belo Horizonte, 03 de novembro de 2009.

MORGAN, F. *et al.* Survival of *Listeria monocytogenes* during manufacture, ripening and storage of soft lactic cheese made from raw goat milk. **Internacional Journal Food Microbiology**, v. 64, p. 217-221-2001.

MOURA, S. M.; DESTRO, M. T.; FRANCO, B. D. G. M. Incidence of *Listeria* species in raw and pasteurized milk produced in São Paulo, Brazil. **International journal of food microbiology**, v. 19, n. 3, p. 229-237, 1993.

NAIDU, A. S.; BIDLACK, W. R.; CLEMENS, R. A. Probiotic spectra of lactic acid bacteria (LAB). **Critical reviews in food science and nutrition**, v. 39, n. 1, p. 13-126, 1999.

NASCIMENTO, G. A. T. **Comparação das características do Queijo Minas Artesanal produzido na região do Campo das Vertentes submetidos à prensagem manual e prensa inox.** 2023. Dissertação. (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Leite e Derivados) – Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora, 2023.

NES, F. **Caracterização molecular e susceptibilidade antimicrobiana de linhagens de *Listeria monocytogenes* isoladas de produtos lácteos no RS.** 2008. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2008.

NUNES, GABRIELA CANDIDO. **Caracterização microbiológica e físico-química de queijos Artesanais de Minas Gerais maturados por afinadores não habilitados na região metropolitana de Belo Horizonte.** Tese (Tecnologia e Inspeção de Produtos de Origem Animal) – Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2020.

NWAIWU, O. What are the recognized species of the genus *Listeria*? **Access Microbiology**, v. 2, n. 9, 2020.

NZFSA – New Zealand Food Safety Authority. **Microbial Pathogen Data Sheets – *Listeria monocytogenes*.** Prepared for the Ministry of Health. p. 1-4, 2002. Disponível em: <http://www.nzfsa.govt.nz/science/data-sheets/listeriamonocytogenes.pdf>. Acesso em: nov. 2023.

OLIVEIRA, L. **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.** Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2014.

OLIVEIRA, S. P. P. *et al.* Características físico-químicas de queijo Minas artesanal do Serro fabricados com pingo e com rala. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, v. 73, n. 4, p. 235-244, 2018.

ORTOLANI, M. B. T. *et al.* Microbiological quality and safety of raw milk and soft cheese and detection of autochthonous lactic acid bacteria with antagonistic activity against *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* spp., and *Staphylococcus aureus*. **Foodborne Pathogens and Diseases**, v.2, n. 7, p. 175-180, 2010.

PEHRSON, M. E. S. F. **Efeito da adição de culturas probióticas sobre aspectos microbiológicos e parâmetros fermentativos de Queijo Artesanal das Terras Altas da**

Mantiqueira. 2017. Tese (Doutorado em Biotecnologia Industrial) – Universidade de São Paulo, Lorena, 2017.

PEREIRA, D. A. **Efeito de diferentes condições de maturação nas características de queijo minas artesanal.** 2019. Tese (Doutorado em Ciência dos Alimentos) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2019.

PERRY, K. S. P. Queijos: aspectos químicos, bioquímicos e microbiológicos. **Química nova**, v. 27, p. 293-300, 2004.

PINHEIRO, J. S. **Maturação do queijo minas artesanal: Comportamento de *Listeria monocytogenes*, aceitação sensorial e predição do tempo por Espectroscopia no infravermelho.** 2018. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri, Diamantina, 2018.

PINTO, M. S. *et al.* Queijo Minas Artesanal da região do Serro: Avaliação de *Staphylococcus aureus* e sua enterotoxina. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, Juiz de Fora, no 336, p. 82-86, 2004.

PINTO, M. S. **Efeito da microbiota endógena e da nisina sobre *Listeria sp.* e *Staphylococcus aureus* em queijo minas artesanal do Serro.** 2008. Tese. (Doutorado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2008.

PINTO, M. S. *et al.* Características físico-químicas e microbiológicas do queijo artesanal produzido na microrregião de Montes Claros-MG. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, 2017.

PINTO, M. S. *et al.* Segurança alimentar do queijo Minas Artesanal do Serro, Minas Gerais, em função da adoção de boas práticas de fabricação. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, v. 39, n. 4, p. 342-347, 2009.

PRETTO, Â. N. *et al.* Kinetic modeling of inactivation of foodborne bacterial pathogens in serrano artisanal cheese during ripening. **Brazilian Journal of Food Technology**, 24, e2019322, 2021.

PYZ-LUKASIK, R. *et al.* Occurrence of *Listeria monocytogenes* in artisanal cheeses from Poland and its identification by MALDI-TOF MS. **Pathogens**, v. 10, n. 6, p. 632, 2021.

RADOSTITS, O. M.; BLOOD, D. C.; GAY, C. C. **Veterinary medicine**, 8th ed. ELBS BailliereTindall. London, 1994.

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. Tese (Doutorado em Ciência dos Alimentos) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2017.

RAMOS, L. P. ***Listeria monocytogenes* em linguças do tipo frescal vendidos a varejo no município de Salvador-BA e eficácia do bacteriófago P100 no controle da contaminação pelo patógeno.** 2009. Dissertação. (Mestrado em Ciência do Alimentos) – Universidade Federal da Bahia, Salvador, 2009.

RESENDE, M. F. S. *et al.* Queijo de minas artesanal da Serra da Canastra: influência da altitude das queijarias nas populações de bactérias ácido lácticas. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 63, p. 1567-1573, 2011.

RISTORI, C. A. *et al.* Prevalence and populations of *Listeria monocytogenes* in meat products retailed in Sao Paulo, Brazil. **Foodborne pathogens and disease**, v. 11, n. 12, p. 969-973, 2014.

ROCHA, Luciana Albuquerque Caldeira. **Caracterização físico-química, microbiológica e de perfis de aminoácidos e de aminas bioativas livres do queijo artesanal da Serra Geral-MG**. Tese (Ciência Animal). Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte. 2021.

ROCOURT, J.; JACQUET, C. H.; REILLY, A. Epidemiology of human listeriosis and seafoods. **International journal of food microbiology**, v. 62, n. 3, p. 197-209, 2000.

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

SÁ, L. F. C. *et al.* Diagnóstico da adoção de boas práticas agropecuárias e de fabricação na produção do Queijo Minas Artesanal do Campo das Vertentes. **Alimentos: Ciência, Tecnologia e Meio Ambiente**, v. 2, n. 9, p. 1-9, 2021a.

SÁ, L. F. C. *et al.* Qualidade microbiológica do queijo Minas artesanal do Campo das Vertentes Microbiological quality of Campo das Vertentes artisanal Minas cheese. **Brazilian Journal of Development**, v. 7, n. 11, p. 110013-110028, 2021b.

SANT'ANA, A. S.; FRANCO, B. D. G. M. ; SCHAFFNER, D. W. Risk of infection with *Salmonella* and *Listeria monocytogenes* due to consumption of ready-to-eat leafy vegetables in Brazil. **Food Control**, v. 42, p. 1-8, 2014.

SANT'ANNA, F. M. *et al.* Microbiological Quality of Minas Artisanal Cheeses from Certified Properties at Serra da Canastra Region, Minas Gerais, Brazil in 2016. **Journal of Dairy & Veterinary Sciences**, v. 6, n. 2, p. 555682, 2018.

SANTOS, A. J. P. **Efeitos do período de maturação de queijos sobre a microbiota deteriorante e *Listeria monocytogenes***. 2016. Dissertação (Mestrado em Saúde Ambiental) – Universidade de Brasília, Brasília, 2016.

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. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) – Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri, Diamantina, 2010.

SANTOS, C. G. *et al.* Condições higiênico-sanitárias na produção de queijo artesanal produzido em Uberaba–MG. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, v. 72, n. 2, p. 96-107, 2017.

SANTO-FILHO, A. DA S. *et al.* Microbiological and chemical characterization of Cabacinha cheese marketed in three municipalities in Vale do Jequitinhonha. **Research, Society and Development**, v. 9, n. 9, 2020.

SCHUCHAT, A.; SWAMINATHAN, B.; BROOME, C. V. Epidemiology of human listeriosis. **Clinical microbiology reviews**, v. 4, n. 2, p. 169-183, 1991.

SETTANNI, L.; MOSCHETTI, G. New trends in technology and identity of traditional dairy and fermented meat production processes: preservation of typicality and hygiene. **Trends in foodscience & technology**, v. 37, n. 1, p. 51-58, 2014.

SICILIANO, C. S.; OLIVEIRA, R.; KUNIGK, C. J. Avaliação do Crescimento de *Listeria innocua* em queijo artesanal. *In: Anais do 11º Seminário Mauá de Iniciação Científica*, 2019. **Anais [...]**. 2019. 1-10.

SILVA, A. S. *et al.* *Listeria monocytogenes* em leite e produtos lácteos no Brasil: uma revisão. **Journal of Health Sciences**, v. 13, n. 1, 2011a.

SILVA, N.; JUNQUEIRA, V. C. A.; SILVEIRA, N. F. A. **Manual de métodos de análises microbiológicas de alimentos**. São Paulo: Livraria Varela, 1997. 295p.

SILVA, J. G. *et al.* Características físico-químicas do queijo Minas artesanal da Canastra. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, v. 66, n. 380, p. 16-22, 2011b.

SILVA, M. C. D.; HOFER, E.; TIBANA, A. Incidence of *Listeria monocytogenes* in cheese produced in Rio de Janeiro, Brazil. **Journal of Food Protection**, v. 61, n. 3, p. 354-356, 1998.

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

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

SOARES, D. B. *et al.* Sanitary and physicochemical analysis and bacteriological adequacy of minas artisanal cheese produced in two properties. **Ciência Animal Brasileira**, v. 19, 2018.

SOBRAL, D. Queijos artesanais de minas, nem todos são QMA: uma breve revisão. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, v. 77, n. 1, 55-67, 2022.

TRABULSI, L. R.; ALTERTHUM, F. **Microbiologia**. 6. Ed. São Paulo (SP): Atheneu, 2016. 920p.

TRMCIC, A. *et al.* Coliform detection in cheese s associated with specific cheese chacaracteristics, but no association was found with pathogen detection. **Journal of Dairy Sciences**, v. 99, n. 8, p. 6105-6120, 2016.

VASCONCELOS, M. A. S.; MELO FILHO, A. B. **Conservação de alimentos**. Recife: EDUFRPE, 2010. 130 p.

VÁZQUEZ-BOLAND, J. A. *et al.* *Listeria* pathogenesis and molecular virulence determinants. **Clinical microbiology reviews**, v. 14, n. 3, p. 584-640, 2001.

VILJOEN, B. C. The interaction between yeasts and bacteria in dairy environments. **International Journal of Microbiology**, v.69, p.37-44, 2001.

WALSTRA, P. *et al.* **Dairy technology: principles of milk properties and processes**. Food science and technology. Marcel Dekker, Inc. New York – Basel. 727p. 1999.

YAMANAKA, E. H. U. *et al.* Qualidade microbiológica de queijos e salames artesanais brasileiros. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v. 75, p. 01-09, 2016.