

MILENE THEREZINHA DAS DORES

**QUEIJO MINAS ARTESANAL DA CANASTRA MATURADO À
TEMPERATURA AMBIENTE E SOB REFRIGERAÇÃO**

Dissertação apresentada à
Universidade Federal de Viçosa, como
parte das exigências do Programa de
Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia
de Alimentos, para obtenção do título de
Magister Scientiae.

VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2007

**Ficha catalográfica preparada pela Seção de Catalogação e
Classificação da Biblioteca Central da UFV**

T

D695q
2007

Dores, Milene Therezinha das, 1980-
Queijo minas artesanal da canastra maturado à temperatura ambiente e sob refrigeração / Milene Therezinha das
Dores. – Viçosa, MG, 2007.
x, 91f. : il. (algumas col.) ; 29cm.

Inclui apêndice.

Orientador: Célia Lucia de Luces Fortes Ferreira.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de
Viçosa.

Referências bibliográficas: f. 72-86.

1. Queijo-de-minas - Análise. 2. Queijo-de-minas -
Microbiologia. 3. Queijarias - Controle de qualidade.
4. Queijo-de-minas - Canastra, Serra da (MG). 5. Queijarias
Aspectos econômicos. 6. Microscopia – Técnica.
I. Universidade Federal de Viçosa. II. Título.

CDD 22.ed. 637.353

MILENE THEREZINHA DAS DORES

**QUEIJO MINAS ARTESANAL DA CANASTRA MATURADO À
TEMPERATURA AMBIENTE E SOB REFRIGERAÇÃO**

Dissertação apresentada à
Universidade Federal de Viçosa, como
parte das exigências do Programa de
Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia
de Alimentos, para obtenção do título de
Magister Scientiae.

APROVADA: 28 de setembro de 2007.

Prof. Mauro Mansur Furtado
(Co-Orientador)

Prof. Antônio Fernandes de Carvalho
(Co-Orientador)

Pesq. Cláudia Lúcia Oliveira Pinto

Pesq. Edna Froeder Arcuri

Prof^ª Célia Lucia de Lucas Fortes Ferreira
(Orientadora)

Aos meus pais

Aos meus irmãos

À pequena Maria Clara

AGRADECIMENTOS

A Deus, responsável por todas as minhas conquistas.

Aos meus pais e irmãos pelo amor, carinho e incentivo durante todos os momentos em minha vida.

À minha sobrinha Maria Clara pela simples existência.

À Universidade Federal de Viçosa junto ao Departamento de Tecnologia de Alimentos (DTA) pela oportunidade.

A FAPEMIG pelo financiamento do projeto.

À professora Célia Lúcia de Luces Fortes Ferreira, idealizadora deste projeto, pela sua orientação, confiança, amizade e dedicação em todas as fases deste trabalho.

Aos professores Antônio Fernandes de Carvalho e Mauro Mansur Furtado pela co-orientação e pelos conhecimentos repassados.

As pesquisadoras Cláudia Lúcia Oliveira Pinto (EPAMIG) e Edna Froeder Arcuri (EMBRAPA) pelas contribuições e sugestões apresentadas para redação final da dissertação.

Aos amigos do Laboratório de culturas láticas do DTA pelos bons momentos vividos em especial a amiga Luciana pela pelo apoio e amizade.

À Juliana e Jose Manoel pela amizade e pela infinita ajuda, sem a qual não seria possível a conclusão deste trabalho.

Às estagiárias e grandes amigas Elisângela e Edimara pelo apoio dedicação e pela preciosa ajuda durante o desenvolvimento deste trabalho.

A todos os professores do DTA que contribuíram para a execução deste trabalho.

A todos os funcionários do DTA, em especial ao Célio, Pio, Dimas, Geralda, Vaninha, Eliana, Maria Rita, Juarez, Sr. Manoel, Sr. Luís e Dona Ligia pela amizade e extrema paciência.

A todos que direta ou indiretamente contribuíram para o desenvolvimento deste trabalho.

SUMÁRIO

	Página
RESUMO	vii
ABSTRACT	ix
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	3
2.1. Queijo Minas Artesanal.....	3
2.2. Queijo artesanal da Serra da Canastra.....	4
2.3. Fabricação do Queijo Canastra	5
2.4. Legislações do queijo Minas artesanal.....	8
2.5. O processo de Maturação	9
2.5.1. Lipólise.....	12
2.5.2. Proteólise.....	12
2.5.3. Enzimas que atuam durante a maturação	15
2.5.3.1. Enzimas do Coalho	15
2.5.3.2. Enzimas naturais do leite	16
2.5.3.3. Bactérias “startes” e suas enzimas	17
2.5.3.4. Bactérias “starters” secundárias	18
2.5.3.5. Bactérias “não starters”	18
2.6. Segurança dos Alimentos.....	19
2.6.1. Microrganismos patogênicos	20
2.6.1.1. <i>Staphylococcus</i> ssp. e suas enterotoxinas.....	20
2.6.1.2. Coliformes a 30°C e Coliformes 45°C	22
2.6.1.3. <i>Listeria</i> sp.....	23
2.6.1.4. <i>Salmonella</i> sp.	24
2.6.2. Microscopia de Alimentos	25
2.6.2.1. Material estranha.....	25
2.6.2.2. Sujidades	26
3. MATERIAL E MÉTODOS	28
3.1. Coleta e Manutenção das Amostras	28

	Página
3.2. Condições de Maturação	28
3.3. Análises microscópicas	29
3.3.1. Preparo das amostras.....	29
3.3.2. Leitura dos Filtros	30
3.4. Análises físico-químicas	31
3.4.1. pH pelo método potenciométrico	31
3.4.2. Determinação de umidade.....	31
3.4.3. Determinação da atividade de água.....	31
3.4.4. Teor de gordura	31
3.4.5. Determinação de gordura no extrato seco	32
3.4.6. Teor de Cloreto de Sódio	32
3.4.7. Ácido láctico	33
3.4.8. Proteína pelo método Kjeldhal.....	33
3.4.9. Extensão de maturação.....	33
3.4.10. Profundidade de maturação.....	34
3.5. Análises Microbiológicas.....	34
3.5.1. Preparo da amostra.....	34
3.5.2. Coliformes Totais e <i>Escherichia coli</i>	34
3.5.3. Contagem Total de mesófilos	34
3.5.4. Contagem de <i>Staphylococcus aureus</i>	35
3.5.5. Pesquisa de <i>Listeria</i> sp. e <i>Salmonella</i> sp.....	35
3.6. Delineamento Experimental.....	35
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	37
4.1. Características Microscópicas	37
4.2. Características físico-químicas dos queijos Minas artesanais da região da Serra da Canastra.	40
4.2.1. Agrupamento das características físico-químicas dos queijos Minas artesanais da região da Serra da Canastra em função do período de fabricação e da temperatura de maturação	49

	Página
4.3. Análises microbiológicas dos Queijos	51
4.3.1. Análise de enterotoxina estafilocócica	66
4.3.2. Agrupamento das características microbiológicas do queijo artesanal da Canastra em função do período de fabricação e da temperatura de maturação.	68
5. CONCLUSÃO	70
REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS	72
APÊNDICES	87

RESUMO

DORES, Milene Therezinha das, M. Sc., Universidade Federal de Viçosa, setembro de 2007. **Queijo Minas artesanal da Canastra maturado à temperatura ambiente e sob refrigeração.** Orientadora: Célia Lucia de Luces Fortes Ferreira. Co-orientadores: Antônio Fernandes de Carvalho e Mauro Mansur Furtado.

O objetivo deste trabalho foi verificar o período mínimo de maturação do queijo Minas artesanal da Canastra, com base nos critérios microbiológicos exigidos pela lei estadual N° 14.185 de 31 de janeiro de 2002, específica para queijos artesanais. Avaliou-se as características físico-químicas e microbiológicas durante 64 dias de maturação nos queijos; a presença de enterotoxina estafilocócica dos queijos com oito dias de fabricação além de identificar materiais estranhos nas amostras também com oito dias de fabricação. Os resultados das análises microscópicas mostraram que as contagens de partículas estranhas no período da seca foi 41,3% maior do que aquelas do período das águas. As partículas de poeira, areia e ardósia foram as mais frequentes. Todas as variáveis físico-químicas sofreram influência do tempo ao longo dos 64 dias de maturação para os queijos armazenados a temperatura ambiente, independente do período de das águas ou da seca. Já as amostras refrigeradas, coletadas no período das águas apresentaram diferença significativa para as variáveis de gordura no extrato seco, nitrogênio solúvel em pH 4,6 e nitrogênio solúvel em TCA 12%. No período da seca apenas o teor de gordura foi influenciado pelo tempo de maturação. Esses dados sugerem uma maior aceleração do processo de maturação para os queijos mantidos à temperatura ambiente. A alteração das variáveis físico-químicas ao longo da maturação para os queijos mantidos a temperatura ambiente teve um papel importante na modulação da microbiota desses queijos o que provocou uma redução do número de contaminantes avaliados. Desta forma, os queijos mantidos à temperatura ambiente atingiram mais rapidamente os padrões mínimos exigidos pela legislação vigente. A espécie *S. aureus* foi a que permaneceu por mais tempo em contagens mais altas

definindo o tempo mínimo necessário para a maturação dos queijos. Assim, independente do período de coleta a temperatura ambiente foi decisiva para redução da microbiota patogênica com 22 dias de maturação. Por sua vez, os queijos maturados sob refrigeração só atingiram os padrões permitidos pela legislação aos 35 dias, para queijos fabricados no período da seca, e, ao valor estimado de 87 dias para aqueles fabricados no período das águas. A enterotoxina do tipo SEA foi detectado em 75% das 16 amostras analisadas, com oito dias de fabricação. Entretanto as toxinas SEB, SEC e SED a análise foi negativa. Os resultados encontrados neste trabalho indicaram que a maturação sob temperatura de refrigeração não foi suficiente para inibir a microbiota patogênica e ao mesmo tempo dificultou a redução desta, o que gera queijos com 60 dias de maturação com baixa qualidade microbiológica e descaracterizado sensorialmente.

ABSTRACT

DORES, Milene Therezinha das, M. Sc., Universidade Federal de Viçosa, September of 2007. **Artisanal Minas cheese from the Canastra Mountain Range matured at room temperature and under refrigeration.** Adviser: Célia Lucia de Luces Fortes Ferreira. Co-Advisers: Antônio Fernandes de Carvalho and Mauro Mansur Furtado.

The purpose of this work was to verify the minimum period of ripening of the artisanal Minas cheese from the Canastra Mountain Range, on the basis of the microbiological criteria demanded by the State Law N. 14,185 from 31st January, 2002, specific for artisanal cheeses. It was evaluated the microbiological and physicochemical characteristics during 64 days of the ripening from the cheeses; the presence of staphylococci enterotoxin of the cheeses with eight days of manufacture, besides the identification of strange materials in the samples with eight days of manufacture. The results of the microscopic analyses showed that the countings of extraneous materials during the dry period were 41.3% greater than those of the raining period. The particles of dust, sand and slate were the most frequent. All the physicochemical variables suffered influence from the time during the 64 days of ripening for the cheeses stored at room temperature, independently of the period, rainy or dry. The refrigerated samples, collected in the raining period showed a significant difference for the variables of fat in the dry extract, pH 4,6 soluble nitrogen, and soluble nitrogen in 12% TCA. In the dry period only the fat index was influenced by the ripening period. These data indicate an acceleration of the ripening process for the cheeses kept at room temperature. The alteration of the physicochemical variables along the ripening for the cheeses kept at room temperature, played an important role in the modulation of these cheeses microbiota, what a reduction of the number of contaminants evaluated. In this way, the cheeses kept at room temperature reached faster the minimum standards demanded by the current law. *S. aureus* was the species one that remained longer in greater countings

defining the necessary minimum time for the ripening of the cheeses. So, independently of the collecting period, the room temperature was decisive for the reduction of pathogenic microbiota with 22 days of ripening. On the other, the cheeses matured under refrigeration, only reached the side standards allowed by the legislation at 35 days for cheeses manufactured in the dry period, and, at an esteemed rate at 87 days for those manufactured in the raining period. The enterotoxin of SEA type was detected in 75% of the 16 analyzed samples, within eight days of manufacture. However for SEB, SEC and SED toxins, the analysis was negative. The results found in this work indicate that the ripening under refrigerated temperature is not sufficient to inhibit pathogenic microorganisms, and at the same time made its reduction difficult, what makes cheeses with 60 days of ripening with low microbiological quality and deprived of sensorial characteristics.

1. INTRODUÇÃO

Produzido a partir de leite cru, o queijo Minas artesanal é provavelmente o mais antigo e tradicional queijo brasileiro, e a sua fabricação até hoje faz parte da cultura de um povo e constitui um patrimônio a ser preservado, como um testemunho do passado e de uma maneira de viver. No Estado de Minas Gerais, esta atividade artesanal é comprovadamente geradora de renda para a agricultura familiar e está presente em 519 dos 853 municípios do Estado. De acordo com dados de 2004, o estado de Minas Gerais produz cerca de 70 mil toneladas de queijo Minas artesanal por ano, desses 33.570 toneladas são produzidas nas quatro regiões tradicionais onde o processo de fabricação foi tombado pelo governo mineiro em 2002. São elas: Serro, Alto Paranaíba, Araxá e Serra da Canastra.

Inserida no circuito das principais regiões produtoras de queijos Minas artesanal do Estado de Minas Gerais, a região da Serra da Canastra é composta pelos municípios de Bambuí, Delfinópolis, Medeiros, Piumhi, São Roque de Minas, Tapiraí e Vargem Bonita, e localiza-se no Centro-Oeste do estado, as margens do rio São Francisco, abrangendo uma área de 6.453 km². Privilegiada pela localização próxima a grandes centros consumidores, pela grande quantidade de água e pelo clima ameno, a região tem na agropecuária uma das principais fontes de riqueza. Produz anualmente 4.470 toneladas de queijo artesanal em mais de duas mil propriedades rurais gerando cerca de 5.000 empregos diretos (EMATER, 2004). Na região de Medeiros 85% de todo o leite produzido é transformado em queijo, o que representa mais de 35% de todo o queijo artesanal produzido na região da Serra da Canastra.

A fabricação tradicional do queijo Minas artesanal caracteriza-se pela adição ao leite cru, recém ordenhado, de um fermento endógeno (“pingo”), coletado da mesma forma em todas as regiões e adicionado para direcionar a fermentação. Hoje, os queijos artesanais ainda são produzidos pela mesma técnica de fabricação que os antepassados, mas vê-se a necessidade de adaptações para adequar este importante produto, as normas higiênicas e sanitárias estabelecidas pela legislação. Por ser um produto bastante

manipulado e produzido com leite cru, o queijo Minas artesanal pode gerar conseqüências graves à saúde pública pela possibilidade de veiculação de microorganismos patogênicos e/ou suas toxinas. Diante deste fato a legislação brasileira (BRASIL, 1996) permite a comercialização do queijo produzido com leite cru, desde que seja maturado por 60 dias a uma temperatura superior a 5°C. Porém este longo tempo de maturação inviabiliza a comercialização do produto, tanto sob aspectos econômicos para o pequeno produtor assim como na descaracterização sensorial do queijo. Já o produto comercializado fresco e refrigerado, como tem sido colocado no mercado, geralmente não atinge os limites microbiológicos estabelecidos pela legislação (ARAÚJO, 2004, PINTO, 2004 e MARTINS, 2006).

Poucos estudos científicos foram feitos, até o momento, comprovando o papel da maturação na modulação das características físico-químicas e microbiológicas dos queijos mineiros com 60 dias de maturação. MARTINS (2006) avaliou o efeito da maturação sobre as características microbiológicas do queijo do Serro armazenado a duas temperaturas, ambiente e sob refrigeração por um período de 64 dias e constatou que em um período de 17 dias a temperatura ambiente (25°C) foi suficiente para enquadrar os queijos com a legislação estadual N°14. 185 (2002), específica para queijos artesanais. No entanto para as mesmas características, no queijo mantido a temperatura de refrigeração, a adequação só foi observada com 63 dias de maturação.

Conhecer os efeitos da maturação sobre a modulação da microbiota patogênica além das características físico-químicas desses queijos faz-se necessário para direcionar as adequações que estão sendo feitas nas unidades produtoras, no treinamento dos produtores, assim como para legalizar a comercialização e permitir que este comércio saia da clandestinidade. Sem a definição do período de maturação a que deverá ser submetido o produto, por lei, a comercialização do queijo artesanal da Serra da Canastra, que é muito consumido e apreciado, continuará sem padrão, a maior parte de sua produção continuará na clandestinidade e muitas vezes poderão colocar em risco a saúde do consumidor.

Diante do exposto, o objetivo principal deste trabalho foi determinar o tempo mínimo necessário de maturação do queijo Canastra, em duas temperaturas de armazenamento, ambiente e sob refrigeração e em dois períodos de fabricação, úguas e seca. Além de avaliar o efeito da maturação na modulação das características físico-químicas, durante um período de 64 dias e identificar a presença de material estranho nos queijos fabricados, com oito dias de fabricação.

2. REVISÃO DE LITERATURA

O Estado de Minas Gerais é o primeiro produtor de leite e de queijos do país, e assim contribui, com um terço da produção nacional. A produção de queijos em Minas Gerais é de aproximadamente 215 mil toneladas por ano, o que representa a metade de todo o queijo consumido pelo brasileiro – 2,7 kg per capita por ano. Dessa produção, 70 mil toneladas por ano vêm do queijo Minas artesanal, produzido em 519 dos 843 municípios mineiros. Essa produção é caracterizada como de pequena escala, sendo fabricado diretamente na fazenda, ocupando 30 mil famílias de pequenos proprietários e mais de 100 mil pessoas. Desses, cerca de 11.000 são produtores das quatro principais regiões do Estado, Serro, Alto Paranaíba, Serra da Canastra e Araxá, consideradas tradicionais e que produzem por ano 33.570 toneladas de queijo em 46 municípios e gera 26.870 empregos diretos (GLOBO RURAL, 2002; ABIQ, 2004; EMATER, 2004).

2.1. Queijo Minas Artesanal

O queijo Minas artesanal é provavelmente o mais antigo e tradicional queijo brasileiro, tendo a sua fabricação iniciada no séc. XIX (FURTADO e LOURENÇO NETO, 1994). De acordo com a Lei Estadual Nº. 14.185, de janeiro de 2002, o queijo Minas artesanal é todo queijo confeccionado conforme a tradição histórica e cultural da região do estado onde for produzido, a partir do leite integral da vaca, fresco e cru, sem nenhum tratamento térmico, retirado e beneficiado na propriedade de origem, que apresente consistência firme, cor e sabor próprios, massa uniforme, isenta de corante e conservantes. Conforme a mesma Lei, o início do processamento do queijo Minas artesanal deve ser até noventa minutos após o começo da ordenha e, na fabricação, devem ser utilizados como ingredientes culturas lácticas naturais como “pingo”, soro fermentado, coalho e sal. O “pingo” também conhecido como cultura endógena, é definido como fermento resultante da dessoragem dos queijos já salgados, e coletado de um dia para outro, sendo, portanto, um soro fermentado com certa quantidade de sal,

que pode agir como inibidor de algumas fermentações indesejáveis e confere ao queijo características físico-químicas e organolépticas específicas (FERREIRA, 2002).

2.2. Queijo artesanal da Serra da Canastra

A região da Canastra localiza-se no sudoeste do Estado de Minas Gerais, e abrange uma área de 6.453 km². O queijo artesanal constitui o principal produto da região sendo produzido em mais de duas mil propriedades rurais em vários municípios que limitam com o Parque Nacional da Serra da Canastra, exclusivamente nos municípios de Bambuí, Medeiros, Piumhi, São Roque de Minas, Tapiraí, Vargem Bonita e Delfinópolis, gerando 5.227 empregos diretos e produção anual de 4.470 toneladas, segundo dados de 2004. Esses valores evidenciam a importância histórica, cultural social e econômica desse produto na agricultura familiar, de subsistência, da região (EMATER, 2003; MINAS FAZ CIÊNCIA, 2006).

A fabricação e consumo do queijo na região da Serra Canastra são confundidos com a história do povoamento local, iniciado com a busca de minerais e pedras preciosas por famílias oriundas de São João D’el Rei, Barbacena e do Sul de Minas que foram em busca de diamantes e outras pedras preciosas. Os primeiros habitantes foram os descendentes dos índios Caiapós e Cataguases, além dos quilombos que foram numerosos por toda a região. O produto era consumido pelas famílias e comercializado junto aos tropeiros que passavam pela região e distribuíam estes produtos para diversas comarcas.

O processamento era rudimentar, sendo o coalho natural, obtido da raspagem do estômago seco do tatu, porco ou do bezerro macho. Como fermento láctico, usava-se o “pingo”, sendo que usualmente era trocado entre os produtores de queijo. A produção era guardada em malas de couro (bruacas ou buracas) e transportada em lombo de muaras ou em carros de boi. Naquela época, em função das dificuldades de transporte, o queijo chegava a ser comercializado com 30 dias a 60 dias de maturação.

Auguste de Saint-Hilaire, em passagem pela região, imortalizou suas percepções por meio da obra “Viagem as Nascente do Rio São Francisco”, onde descrevia minuciosamente tudo que encontrava pelo caminho. J. Emanuel Pohl (1818) também descreve a região de Bambuí e a beleza do Rio São Francisco no seu livro “Viagem ao

Interior do Brasil”. Ambos, no século XIX, relataram o queijo artesanal como produto de expressão na alimentação e na economia regional.

2.3. Fabricação do Queijo Canastra

O processo de produção do queijo Canastra é artesanal e obedece a normas regulamentadas que abrangem a produção de queijos artesanais produzidos a partir de leite cru, beneficiados nas queijarias das propriedades rurais, sem utilização de técnicas industriais (Lei estadual Nº14.185/2002). Por ser artesanal, cada produtor segue uma tecnologia própria, muitas vezes passada de pais para filhos através de gerações. Essa flexibilidade da tecnologia resulta em produtos sem uniformidade. Na Figura 01 é apresentado o fluxograma de fabricação e na Figura 02 está indicado as principais etapas do processo de fabricação do queijo Canastra. Imediatamente após a ordenha, que pode ser manual ou mecânica, o leite passa pelo processo de filtragem que é feito por meio de filtro ou tecido sintético, em seguida o leite é transferido para o tanque de fabricação, onde é adicionado o “pingo” e o coalho.

Após a coagulação, a coalhada é deixada em repouso por cerca de cinco minutos, seguida de agitação lenta de, aproximadamente, meia hora até a obtenção da massa firme. A partir daí, é eliminado parte do soro e feita à compressão da massa nas fôrmas, com as mãos e com auxílio de um tecido. A salga é realizada primeiro de um lado do queijo e, após duas horas, na outra face, neste momento é que, o “pingo” é coletado para produção do queijo do dia seguinte. Os queijos são tirados da fôrma no dia posterior, maturados por um período que varia de 8 dias a 15 dias, dependendo da preferência do consumidor e enfim levados para o comércio.

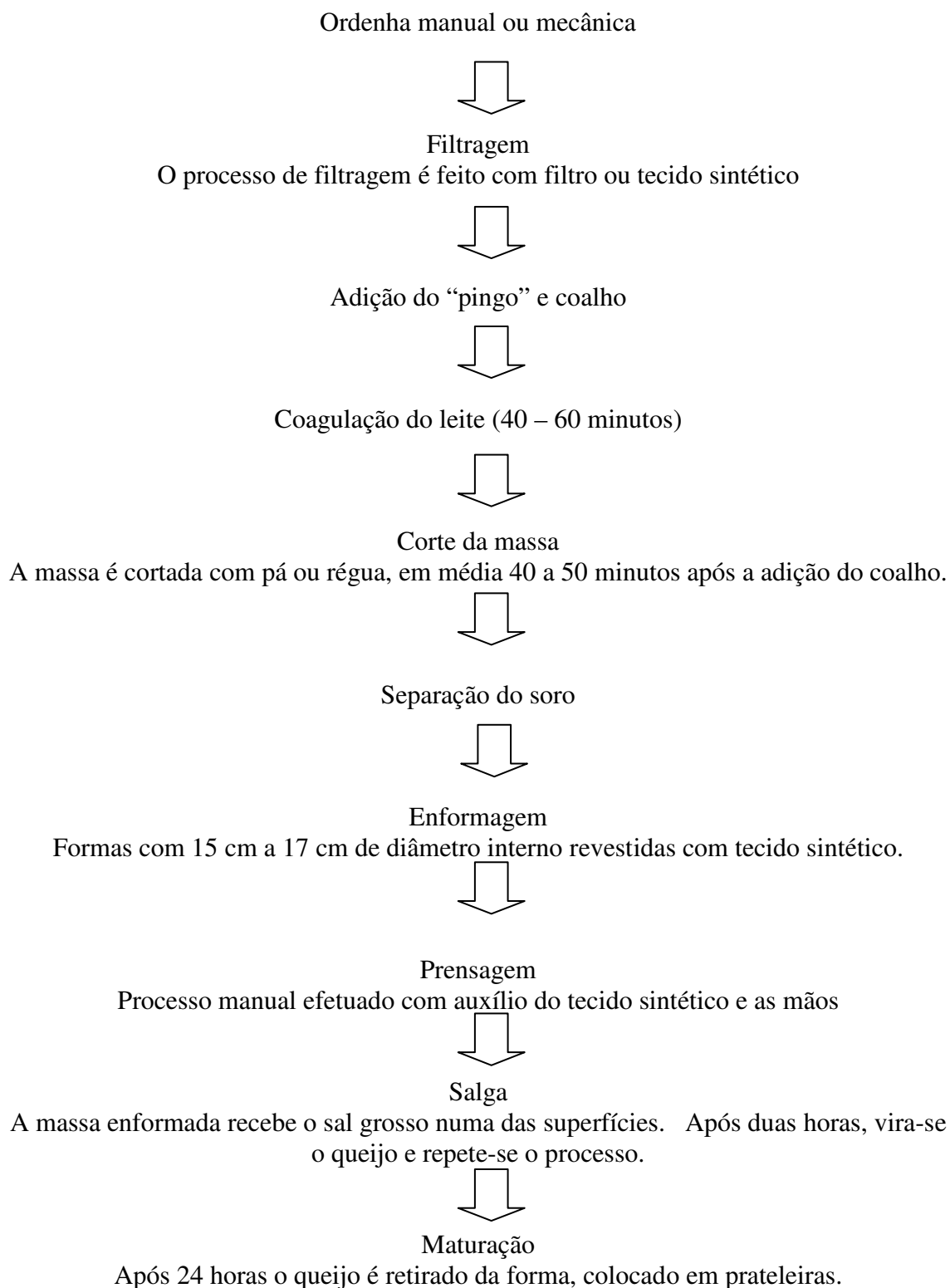


Figura 1 – Fluxograma de produção do queijo Minas artesanal da Canastra (EMATER, 2004).



Figura 02 – Principais etapas do processo de fabricação do queijo da Canastra. A: Ordenha; B: Filtro externo à queijaria; C: Filtro interno à queijaria; D: Corte da massa; E: Enformagem; F: Prensagem; G: Coleta do “pingo” e H: Maturação.

O queijo da Serra da Canastra possui formato cilíndrico com, aproximadamente, 18 cm de diâmetro, 4 cm a 6 cm de altura e pesa em torno de um quilo, sendo que em algumas propriedades o queijo é produzido com diâmetro ligeiramente maior e um pouco menor em altura (Figura 03). Sua casca é esbranquiçada, tendendo a transformar-se numa crosta fina e amarelada quando maturado por alguns dias. A massa é branca e resistente, às vezes ligeiramente quebradiça. Apresenta aberturas mecânicas de pequeno tamanho e é comum a presença de pequenas olhaduras irregulares. O queijo Minas artesanal apresenta características próximas àquelas do queijo Minas Padrão, com sabor típico e acentuadamente mais ácido. (EMATER, 2003; IMA,2007).



Figura 03 – Queijo Minas artesanal da região da Serra da Canastra após 22 dias de maturação.

2.4. Legislações do queijo Minas artesanal

Atualmente a legislação brasileira proíbe a comercialização de queijos produzidos com leite cru, a não ser que este seja maturado por um período mínimo de 60 dias, a uma temperatura superior a 5°C (RESOL. N°7, DE 28/11/2000 – ANEXO I). Este longo período de maturação inviabiliza a comercialização legal do queijo, que normalmente é comercializado com uma semana de maturação a temperatura de refrigeração. Com o objetivo de resguardar a segurança alimentar dos consumidores o governo do estado de Minas Gerais, lançou leis específicas para os queijos Minas Artesanais como a lei estadual N°14.185 de 31 de janeiro de 2002, que estabelece critérios de funcionamento e controle da produção desses queijos. Essa lei segue os mesmos critérios da Legislação Federal (BRASIL, 1996) para queijos indústrias de alta umidade. Além de determinar

parâmetros microbiológicos (Tabela 1), a lei estadual estabelece também critérios de qualidade no processamento, na obtenção da matéria-prima, da água e adequação das queijarias, currais, equipamentos, utensílios e manipuladores.

As boas práticas agropecuárias regulam a produção do queijo Minas artesanal por meio de três portarias do Instituto Mineiro de Agropecuária (IMA): Portaria N° 517, de 14 de junho de 2002 que estabelece normas de defesa sanitária para rebanhos fornecedores de leite para a produção de queijo Minas artesanal; Portaria N° 518, de 14 de junho de 2002 que dispõe sobre requisitos básicos das instalações, materiais e equipamentos para a fabricação do queijo Minas artesanal; e Portaria N° 523, de 23 de julho de 2002 que estabelece normas sobre as condições higiênico-sanitárias e as boas práticas de manipulação e fabricação.

Tabela 1 – Parâmetros microbiológicos estabelecidos pela Lei estadual N° 14.185 de 2002 para queijos artesanais e pela Legislação Federal, para queijos industriais.

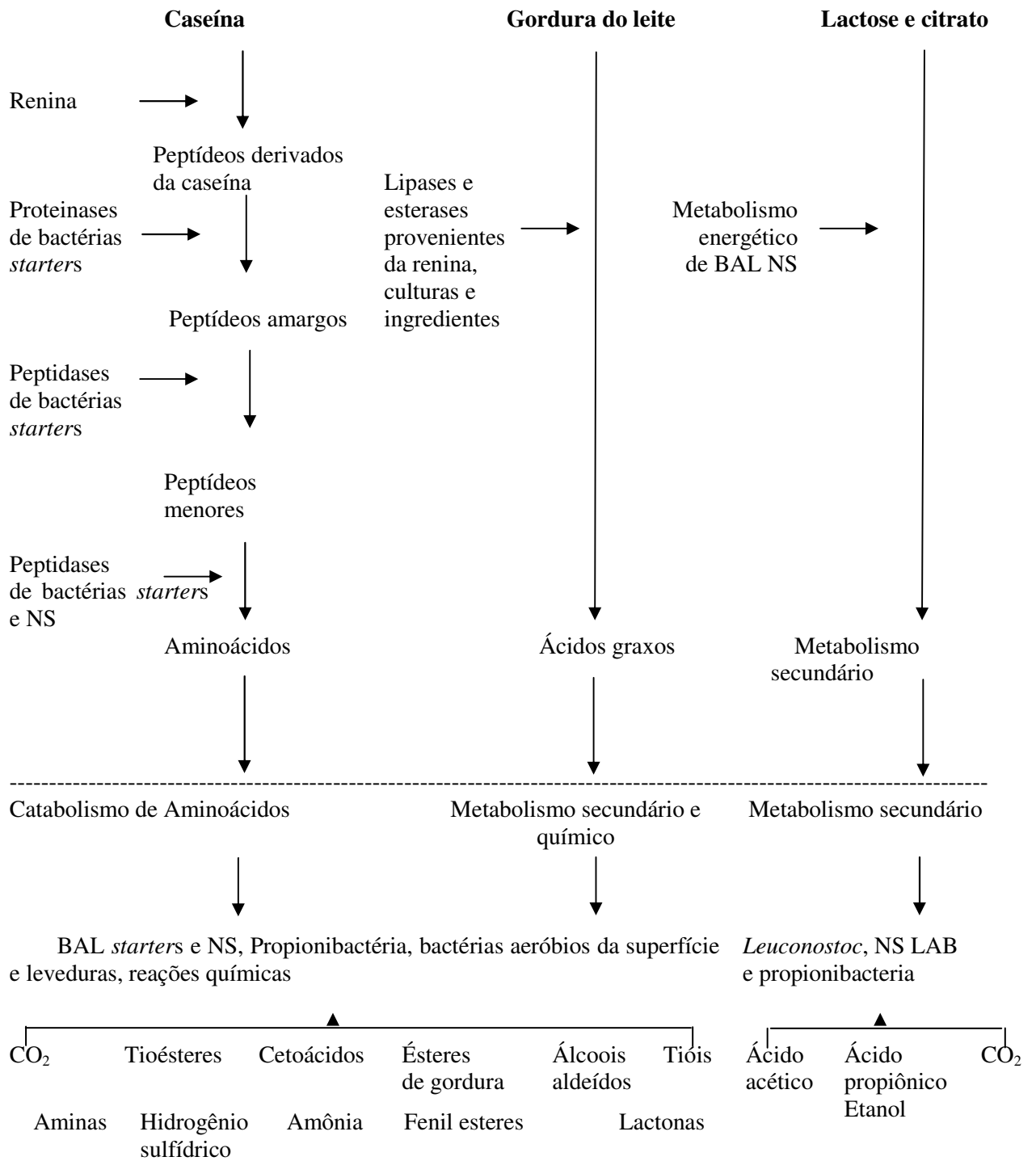
Microorganismo	Lei Estadual	Legislação Federal (Queijos)	
	Lei nº 14.185	Alta Umidade	Média Umidade
Coliformes 30° C	n = 5 c = 2 m = 5.000 M = 10.000	n = 5 c = 2 m = 5.000 M = 10.000	n = 5 c = 2 m = 1.000 M = 5.000
Coliformes 45° C	n = 5 c = 2 m = 1.000 M = 5.000	n = 5 c = 2 m = 1.000 M = 5.000	n = 5 c = 2 m = 100 M = 500
<i>Staphylococcus</i> Coagulase +	n = 5 c = 2 m = 100 M = 1.000	n = 5 c = 2 m = 100 M = 1.000	n = 5 c = 2 m = 100 M = 1000
<i>Listeria</i> sp	n = 5 c = 0 m = 0	n = 5 c = 0 m = 0	n = 5 c = 0 m = 0
<i>Salmonella</i> sp	n = 5 c = 0 m = 0	n = 5 c = 0 m = 0	n = 5 c = 0 m = 0

Fonte: Lei nº 14.185, de 31/1/2002; BRASIL (1996).

2.5. O processo de Maturação

O processo de maturação do queijo compreende um conjunto de complexas modificações bioquímicas que incluem proteólise, lipólise e a glicólise (FOX, 1993). Como resultado deste processo os principais componentes do queijo, como proteínas,

lipídeos e lactose, são transformados em produtos primários e as modificações ocorridas nesses com maior ou menor intensidade levam os produtos secundários. (FOX et al., 1993). Entre os principais componentes resultantes do processo de maturação estão os aminoácidos, aminas, ácidos, tióis, tioésteres de proteínas; ácidos graxos, metilcetonas, lactonas e ésteres de lipídeos; ácidos orgânicos como, o láctico, acético e propiônico; dióxido de carbono, ésteres e alcoóis da lactose, sendo esses os principais responsáveis pelas características sensoriais e físicas de cada tipo de queijo (FOX,1993) (Figura 04).



BAL - Bactérias do ácido láctico. NS - não starters

Fonte: LAW (2001)

Figura 04 - Bioquímica básica da maturação de queijo.

2.5.1. Lipólise

A hidrólise da gordura presente no leite, denominada lipólise, é importante na formação do aroma, porém não altera a textura do queijo. Na maioria dos queijos a lipólise não é extensa, sendo um pouco mais significativa para queijos oriundos de leite cru. (FOX, 1993). As lipases ativas no queijo provêm de microrganismos e das lipases naturais do leite. Sendo estas últimas inativadas por valores de pH inferiores a 6,5 e por temperaturas elevadas.

Já as bactérias do ácido láctico (BAL) não utilizam a gordura do leite como fonte de energia e são basicamente sacarolíticas. Essas enzimas atuam sobre os triacilgliceróis, e produzem ácidos graxos de cadeia curta como butírico, caprótico, caprilico e cáprico (FERREIRA, 2001). A lipólise nos queijos é influenciada pelo aumento de temperatura, população alta de bactérias psicotróficas e homogeneização do leite (WASTRA, NOOMEN e GEURTS, 1999).

2.5.2. Proteólise

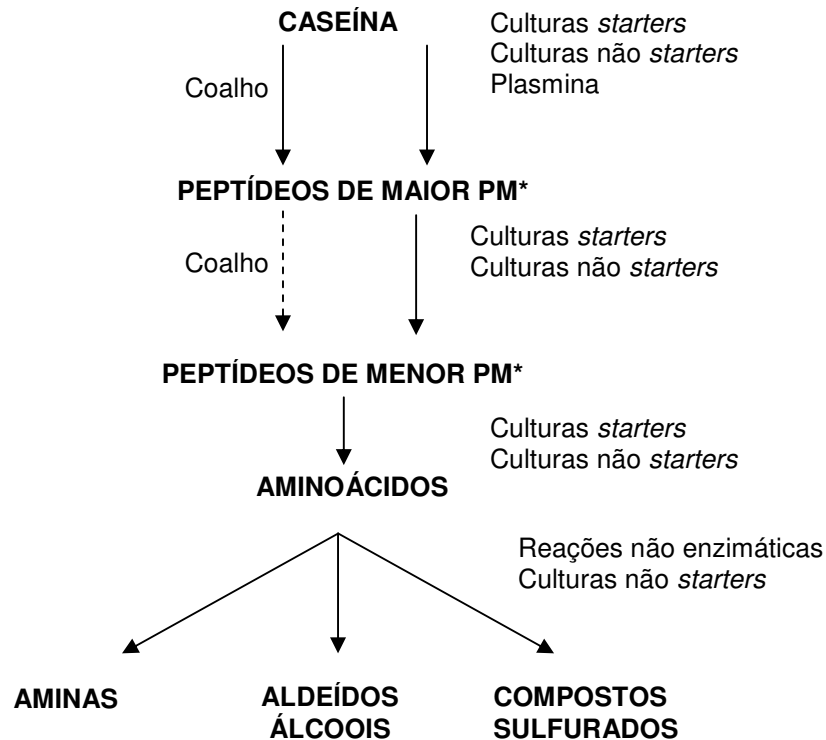
Durante os processos bioquímicos envolvidos durante a maturação de queijos, a proteólise é a mais complexa e, e possivelmente a mais importante. Consiste na degradação das proteínas em produtos mais simples e mais solúveis. Neste processo, a caseína é hidrolisada a peptídeos de alto, médio e baixo peso molecular, aminoácidos, amidas e amônias, por enzimas proteolíticas (FARKYE, 1995), cuja procedência pode ser do próprio leite, das bactérias que contaminam o leite, do coalho ou enzima coagulante, das bactérias lácticas ou mesmo da flora secundário (SOUSA, ARDO e McSWEENEY, 2001).

Dois fases caracterizam o fenômeno de proteólise, a proteólise primária e a secundária. A proteólise primária compreende as reações responsáveis pela formação de peptídeos de médio ou alto peso molecular a partir da caseína, que influencia no desenvolvimento da textura, esse tipo de proteólise é catalisada por ação das enzimas do coalho e das proteases naturais do leite, como as, plasminas e catepsinas D (LAWRENCE, et al., 1987; ROSENBERG et al., 1995; EARLY, 1998). A proteólise secundária, na qual intervêm as proteinases e peptidases microbianas, produz peptídeos, aminoácidos e outras substâncias nitrogenadas de baixo peso molecular, a partir dos

quais formam substâncias aromáticas voláteis e não voláteis (RANK, et al., 1985 e LAWRENCE, et al., 1987)

A proteólise contribui para as modificações ocorridas na textura, por meio da quebra da rede protéica, diminuição da atividade de água, formação de novas ligações entre a água, grupos carboxilas e aminos liberados, e com o aumento do pH, principalmente para variedades de queijos maturados por fungos, o que facilita a liberação de compostos aromáticos. Sua contribuição direta para o sabor ocorre mediante a formação de peptídeos e aminoácidos livres, assim como a liberação de substratos (aminoácidos) para reações de transaminação, deaminação, descarboxilação, dessulfuração, catabolismo de aminoácidos aromáticos e reações de aminoácidos com outros compostos (SOUSA, ARDO e McSWEENEY, 2001). O teor de sal afeta diretamente a proteólise, pois inibe o desenvolvimento das bactérias lácticas, o que diminui a produção de enzimas proteolíticas. (KINDSTEDT, 1993).

Como modificação bioquímica mais complexa da maturação, a proteólise é causada por agentes proteolíticos de diversas fontes. A função desses agentes é hidrolisar a caseína em peptídeos e aminoácidos. Segundo SOUZA, ARDO e McSWEENEY (2001), esta atividade nos queijos durante a maturação é influenciada pelo sistema de proteinases e peptidases do coagulante residual, das enzimas endógenas do leite, do fermento láctico, bactérias lácticas que não fazem parte do fermento, e culturas lácticas secundárias, como por exemplo, bactérias propiônicas, *Brevibacterium*, *Arthobacter*, *Penicillium* ssp, além da razão sal/umidade, temperatura de maturação e modificação do pH durante a maturação. Na Figura 05 indica as etapas de degradação da caseína durante a fabricação e maturação do queijo.



Fonte: MENÉNDEZ et al., (1999)
 *PM = peso molecular

Figura 05 – Fluxograma da degradação da caseína durante o processo de fabricação e maturação.

O método tradicional para determinação do grau de proteólise baseia-se na determinação das frações nitrogenadas, como nitrogênio solúvel, o nitrogênio não protéico, o nitrogênio amínico e o amoniacal. As frações nitrogenadas são compostos, cuja única característica comum é apresentar nitrogênio em sua molécula. Estas frações são determinadas durante o processo de maturação de vários tipos de queijos, com o objetivo de verificar a intensidade de solubilização da caseína durante a maturação pelo fracionamento dos compostos solúveis e insolúveis e quantificação pelo método Kjeldahl ou por métodos espectrofotométricos.

O grau de proteólise pode ser medido, por meio de índices denominados índice de extensão e índice de profundidade. O índice de extensão de maturação (IEM) é caracterizado pelo teor de substâncias nitrogenadas solúveis acumuladas na fase aquosa dos queijos. Pode ser expresso em porcentagem de nitrogênio total, sendo consequência da ação proteolítica das enzimas do coalho e da plasmina sobre a caseína liberando peptídeos de alto peso molecular (WOLFSCHOON-POMBO e LIMA, 1989). A determinação analítica baseia-se na precipitação isoelétrica da caseína a pH menor que

4,6 em uma amostra de queijo e a quantificação das substâncias solúveis pode ser efetuada pelo método de Kjeldahl (FARKYE e FOX, 1990).

O índice de profundidade (IPM) da proteólise relaciona as substâncias nitrogenadas de baixo peso molecular acumuladas durante o processo de maturação, em função principalmente à ação proteolítica das enzimas microbianas sobre compostos nitrogenados oriundos da degradação da caseína. O IPM pode ser quantificada pelo teor de nitrogênio não protéico (NPN), medido pelo nitrogênio solúvel em TCA 12%.

2.5.3. Enzimas que atuam durante a maturação

A maturação é uma etapa importante no desenvolvimento da textura, do sabor e do aroma nos queijos. O processo de maturação é considerado basicamente um processo enzimático, onde cerca de cinco agentes estão envolvidos na maturação do queijo entre eles estão i) as enzimas do coalho, ii) enzimas naturais do leite, iii) enzimas de bactérias “*starter*”, iv) enzimas de bactérias “*starter*” secundários e v) enzimas de bactérias “ não *starter*” (FOX, 1993).

2.5.3.1. Enzimas do Coalho

Além da função coagulante das enzimas do coalho, importante para a fabricação de queijos, sua ação proteolítica desempenha um papel importante na proteólise primária do queijo (VICENTE et al., 2001). Segundo FRESNO BARO (2000), as enzimas coagulantes empregadas na fabricação de queijos, exercem ações características, que dependeram do tipo de enzima empregada, podendo ser de origem animal (estomago de bezerro, carneiro, etc.), microbiana (*Bacillus subtilis*, *Rhizomucor miehei*, *R. pusillus*, *Chryphonectria parasítica*, etc.), vegetal (*Cynara cardunculus*, *Ficus carica*, *Carica papaya*), obtidas por engenharia genética ou recombinante, genes de quimosina clonado em bactérias fungos ou leveduras. Essas enzimas são endopeptidases que cortam as cadeias protéicas em pontos de clivagem específicos e liberam peptídeos e aminoácidos. Na fabricação do queijo grande parte da atividade do coagulante é perdida no soro e cerca de 6%, do coagulante adicionado ao leite, é retido no queijo, chamado de coalho residual (FOX, 1993). A atividade residual

é dependente do tipo de enzima coagulante, das condições de fabricação, como por exemplo pH do leite e temperatura de cozimento da massa, e do conteúdo final de umidade e variedade dos queijos. A quimosina e a pepsina, bovina ou suína, são ativas em pH reduzido, embora as pepsinas sejam mais sensíveis à desnaturação pelo pH do que a quimosina. A retenção da quimosina na massa depende do pH do leite antes e após a coagulação (SOUSA, ARDÖ e MCSWEENEY, 2001).

Segundo SILVA et al., (1995), a quimosina promove uma proteólise específica sobre a β -caseína na ligação peptídica Phe₁₀₅ – Met₁₀₆ e formam dois seguimentos: 01 a 105, chamada de para-k-caseína que é insolúvel na presença de cálcio e passa a fazer parte da estrutura do coágulo e o segmento 106 a 169, chamado de caseinomacropéptídeo que é solúvel na presença de cálcio, sendo perdido no soro. A quimosina é desnaturada com temperaturas ao redor de 52°C, e perde sua atividade residual, em queijos como Gouda e Artesanais, onde a temperatura de cozimento da massa é baixo ou inexistente, a quimosina apresenta considerável atividade residual (SOUSA, ARDÖ e MCSWEENEY, 2001).

2.5.3.2. Enzimas naturais do leite

Entre as principais proteínas naturais do leite, encontram-se as lipases e as proteases que possuem importância fundamental na maturação do queijo. As lipases naturais do leite atuam sobre os lipídeos liberando ácidos graxos de cadeia curta que irão acentuar o sabor e o aroma dos queijos durante a maturação. Entretanto, a hidrólise de ácidos graxos contendo de 4 carbonos a 10 carbonos conferem sabor desagradável ao produto, enquanto ácidos graxos de 14 a 22 carbonos são sensorialmente inativos (NACIMENTO et al., 2000)

As proteases naturais do leite possuem um papel importante na proteólise primária dos queijos. A plasmina é a protease mais importante do leite, enquanto que a elastase, a colagenase e a catepsina B, D, G, H, não estão bem caracterizadas e apresentam baixa concentração no leite (SOUSA, ARDO e McSWEENEY, 2001).

A plasmina é uma serina protease com o pH ótimo em torno de 7,5 no leite fresco e encontra-se associada à micela de caseína, e uma pequena parte encontra-se aderida à membrana do glóbulo de gordura, mas dissocia-se com a diminuição do pH (FOX, 1993). Quando o leite é submetido ao tratamento térmico a um aumento da

concentração desta enzima uma vez que, inativa os inibidores do ativador do plaminogênio, que é o precursor inativo da plasmina, forma ativa da enzima (SOUSA, ARDO e McSWEENEY, 2001). Sendo assim, a plasmina apresenta uma maior atividade nos queijos de massa cozida do que naqueles de massa não cozida, e pode ocorrer diferenças dentro de um mesmo queijo, devido as diferentes formas de fabricação e qualidade do leite (FARKYE e FOX, 1990). Esta protease age principalmente sobre a β - caseína por ser proteína mais sensível a ação desta enzima a qual age sobre as ligações.

A catepsina D possui uma ação similar a da quimosina, porém não possui função proteolítica em produtos lácteos preparados a partir de leite pasteurizado, atua na ligação Phe105-Met106, da caseína que contribui assim como a quimosina na liberação de peptídeos de tamanho intermediário a grande. (SOUSA, ARDO e McSWEENEY , 2001).

2.5.3.3. Bactérias “startes” e suas enzimas

As culturas lácticas utilizadas na fabricação de queijos incluem espécies mesófilicas de *Lactococcus* e *Leuconostoc*, e espécies termófilicas de *Lactobacillus* e *Streptococcus*. O principal papel de uma cultura “*starter*” é a produção de ácido láctico e conseqüente diminuição do pH. As bactérias produtoras de ácido láctico (BAL) são fracamente proteolíticas, porém apresentam um sistema proteolítico (proteínase/peptidase) capaz de hidrolisar oligopeptídeos em peptídeos menores e aminoácidos. Durante a maturação dos queijos as BAL possuem dois tipos de enzimas que possuem um papel importante na proteólise dos queijos: i) endopeptídases ou proteases, que hidrolisam as proteínas liberando peptídeos e, ii) as exopeptídases (aminopeptídases, carboxipeptídases, dipeptidases), que fracionam os peptídeos em aminoácidos (SOUSA, ARDO e McSWEENEY , 2001).

As peptidases são lançadas a matriz do queijo após autólise celular provocadas pela autolisinas, enzimas líticas que catalisam a hidrólise de ligações específicas do peptidoglicano, o principal componente da parede celular das bactérias. A autólise também pode ocorrer de forma espontânea, quando as bactérias alcançam à fase estacionária de crescimento ou quando se encontram em condições fisiológicas desfavoráveis (SOUSA, ARDO e McSWEENEY , 2001).

2.5.3.4. Bactérias “starters” secundárias

Em muitas variedades de queijos as culturas secundárias são particularmente importantes na degradação protéica. Podem ser utilizadas como culturas adjuntas ou estarem presentes devidos às características regionais de onde o queijo é produzido (FOX et al., 1993). Entre as principais encontram-se as Bactérias Propiônicas, *Brevibacterium linens*, fungos filamentosos e leveduras, como *Penicillium roqueforti* e *Penicillium candidum*. Essas culturas possuem a capacidade de crescerem na superfície ou no interior da massa do queijo ou ainda produzirem CO₂, acetato e propionato, em função da espécie utilizada (FOX et al., 1993 e SOUSA, ARDO e McSWEENEY, 2001). Os fungos filamentosos, principalmente do gênero *Penicillium*, possuem endopeptidases exocelulares que degradam a caseína e exopeptidases que degradam os peptídeos presentes em aminoácidos (CHOISY et al., 1987). Já as *Brevibacterium linens* são responsáveis pela produção de importantes compostos do flavor (VARNAM e SUTHERLAND, 1996). As leveduras, que também fazem parte da microbiota do queijo e possuem a capacidade de aumentar o pH da massa, assimilando o ácido láctico presente.

2.5.3.5. Bactérias “não starters”

Entre os principais gêneros de bactérias “não starter” estão presentes nos queijos encontra-se os *Micrococcus*, os *Enterococcus*, os *Pediococcus* e os *Lactobacillus*, entre outras. Estão geralmente presentes no leite cru e em alguns casos são resistentes e/ou possuem enzimas resistentes ao processo de pasteurização (CHOISY et al., 1987).

As bactérias psicrotólicas, que são bactérias que possuem a temperatura ótima de crescimento em torno de 20°C a 30°C, mas são capazes de crescer em temperaturas de refrigeração (2 a 7°C). São microrganismos que produzem enzimas termorresistentes e atuam principalmente nas caseínas e causam sabor amargo no queijo, cujo defeito é difícil de ser eliminado (VISSER, 1993). Entre os gêneros de psicrotólicas podem ser citados as *Pseudomonas*, *Achromobacter*, *Alcaligenes* e *Enterobacter* (BRITO e DIAS, 1998). As proteases produzidas por esses gêneros contribuem para a perda do rendimento nos queijos em até 5%, pela quebra das proteínas do leite e causam a perda de compostos nitrogenados para o soro (EARLY, 1998).

2.6. Segurança dos Alimentos

Um alimento seguro é aquele que não oferece risco à saúde do consumidor, pela presença de perigos que de acordo com o sistema de análise de perigos e pontos críticos de controle (APPCC), pode ser definido como a contaminação inaceitável de natureza biológica, química ou física, que possam causar dano à saúde ou à integridade do consumidor (ROBBS e CAMPELO, 2002). Os derivados de leite, e principalmente os queijos, são alimentos altamente nutritivos, ideais para o crescimento de microrganismos patogênicos como também os microrganismos deteriorantes. *Salmonella*, *Bacillus cereus*, *Brucella*, *Campylobacter*, *Campylobacter*, *Escherichia coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes* e *Staphylococcus aureus* são alguns exemplos de microrganismos patogênicos associados a surtos de toxinfecções alimentares, onde leite e produtos lácteos foram envolvidos (HAJDENWURCEL, 2002). De acordo com SENA (2000), os queijos fabricados com leite cru e sem controle higiênico sanitário satisfatório, podem resultar em contaminação microbiana, inclusive por *S. aureus* e *E.coli*, o que representa perigo a saúde do consumidor. Vários trabalhos realizados sobre a qualidade microbiológica dos queijos artesanais (SENA, 2000; BORELLI, 2006; MARTINS, 2006; ORNELLAS, 2005) mostram que os produtos encontravam-se em condições higiênicas insatisfatórias, entre os microrganismos potencialmente capazes de contaminar esses queijos, destacam-se a *E. coli*, o *Staphylococcus* sp., *Salmonella* sp. e suas toxinas, *Listeria monocytogenes* (JAY, 2005).

Resíduos de antibióticos, micotoxinas, pesticidas e metais pesados são exemplos de perigos químicos que podem estar presentes no leite cru. Já os perigos físicos são constituídos por materiais estranhos, que possam vir a causar algum dano à saúde do consumidor (HAJDENWURCEL, 2002), a presença de material estranho no leite pode ocorrer desde o momento em que este é extraído do úbere do animal, até o produto acabado, podendo vir a contaminá-lo por meio de vários fatores como falha nos processos de filtração do leite ou contaminação durante ao processo de elaboração do leite (BORSARI, 2001).

2.6.1. Microrganismos patogênicos

2.6.1.1. *Staphylococcus* ssp. e suas enterotoxinas

O gênero *Staphylococcus* pertence à família Micrococaceae e é subdividido em 36 espécies e 21 subespécies (GIAMMARINARO et al., 2005) algumas espécies coagulase negativa como *Staphylococcus gallinarum*, *Staphylococcus simulans*, *Staphylococcus equirum*, *Staphylococcus lentus*, *Staphylococcus capitis* e *Staphylococcus xylosus* (VERNOZY-ROZAND et al., 1996; RAPINI et al., 2002) também produzem enterotoxina, embora a legislação brasileira estabeleça limites apenas para espécies estafilocócicas coagulase positiva (CRASS e BERGDOLL, 1986; PEREIRA, 1999). A presença de *Staphylococcus* coagulase positiva em alimentos chega a 97% e destas 30,5% são enterotoxigênicas sendo o *S. aureus* a espécie mais frequentemente isolada (ROSEC et al., 1997). As enterotoxinas de *S. aureus* representam um dos principais responsáveis por gastroenterites de origem alimentar, sendo as carnes e os derivados de leite os principais elementos responsáveis por esse tipo de problema (GÓMEZ-LUCIA et al., 1986).

Surtos de intoxicações associados a leite e derivados são relatados tanto em países desenvolvidos como em países em desenvolvimento (DE BUYSER et al., 2001). No Brasil, alguns estudos indicaram a ocorrência de surtos envolvendo *S. aureus* e outras espécies após consumo de leite e derivados. Do CARMO et al., (2002) relataram surtos de intoxicação após ingestão de queijo e leite “*in natura*” no estado de Minas Gerais envolvendo 328 pessoas e tendo como agentes etiológicos envolvidos *S. aureus* e *S. epidermidis* (coagulase negativa). Em outro estudo VERAS et al., (2003) relataram vários surtos de intoxicação alimentar após a ingestão de queijos no estado de Minas Gerais, provocados principalmente por *S. aureus*. No entanto não se tem relatos de problemas dessa natureza em queijos produzidos com a tecnologia estabelecida para a produção dos queijos artesanais com uso de fermento endógeno.

A contaminação por *S. aureus* em leite e derivados pode ocorrer em função de excreções provenientes da mastite clínica e subclínica (SCHERRER et al., 2004) ou por práticas higiênicas inadequadas durante o processamento e manuseio do alimento. Este microrganismo pode representar um risco à saúde humana quando o leite não é submetido à pasteurização (SANTOS et al., 1981), pois além de produzir enterotoxinas termorresistentes (SILVA et al., 1997), possuem a capacidade de permanecer em um

estado de injúria, do qual podem se recuperar, quando o ambiente for favorável, e retornar ao estado fisiológico normal, multiplicando e produzindo enterotoxinas (ASSIS, 1990). Portanto, o seu crescimento deve ser evitado, para impedir a produção de enterotoxinas que podem causar intoxicação quando os níveis de *S. aureus* no alimento ultrapassar 10^6 ufc g⁻¹ (CARMO et al., 2002). Métodos preventivos são as melhores opções para o controle de *S. aureus* em leite e seus derivados, já que depois de contaminado, a redução do número desse microrganismo não garante a inocuidade do produto (GAYA et al., 1988).

Enterotoxinas estafilocócicas (SE) representam a família dos principais grupos sorológicos de toxinas termoestáveis; elas agem como potentes toxinas gastrintestinais e exibem atividade de superantígeno (BALANBAM et al., 2000). As SE constituem um grupo de proteínas de cadeia simples de baixo peso molecular produzidas por algumas espécies de *Staphylococcus*, principalmente *S. aureus* (SU e WONG, 1997). Os aminoácidos compostos pelas enterotoxinas são similares em alguns aspectos como, alto teor de lisina, ácido aspártico e tirosina. As suas seqüências já foram clonadas para a localização dos genes responsáveis pela codificação destas proteínas (BERGDOLL, 1990). Essas enterotoxinas são classificadas em SEA (Staphylococcal Enterotoxin A), SEB, SEC (SEC1, 2 e 3), SED, SEE, SEG, SEH e SEJ (JARRAUD et al., 2001; CARMO et al., 2002). Novas SE foram identificadas: SEK, SEL, SEM, SEO, SEP, SEQ e SEU (ORWIN et al., 2003; SCHERRER et al., 2004).

A produção de SE varia de acordo com uma série de fatores (Tabela 2) que influencia no grau de patogenicidade no homem. A ingestão de SE, além de gastroenterites pode causar baixa pressão sanguínea, hipotensão, edema pulmonar e outras (BERGDOLL, 1990), embora em casos isolados, altas concentrações de SE podem causar morte (SCHERRER et al., 2004). BERGDOLL (1990) ainda relata que a quantidade de enterotoxina requerida para produzir a doença em indivíduos sensíveis é variada, pode ser de 100ng a 1ng. Outro fator de virulência descrito na literatura é a toxina da síndrome do choque tóxico (TSST-1) (CARDOSO, 1999). Essa toxina é provavelmente susceptível à clivagem pela pepsina e pode ser menos estável nos intestinos em comparação com SE (DINGES, 2000). A doença causada pela TSST-1 é aguda e caracteriza-se por febre alta, hipotensão e envolvimento de três ou mais órgãos sistêmicos, dentre outros (CHESNEY, 1989).

Tabela 2 – Fatores que afetam a produção de enterotoxina em alimentos

Fatores	Produção de enterotoxina
Temperatura	10°C – 45°C (Ótimo a 37°C)
PH	5,2 – 9,0 (Ótimo a 6,5 – 7,5)
Aw	>0,90 (Ótimo a 0,99)
Condições Atmosféricas	Condições aeróbicas e anaeróbicas
Microbiota Concorrente	Geralmente só há produção de enterotoxina quando a contaminação inicial for elevada

Fonte: BERGDOL (1990)

A produção de SE necessárias para ocasionar a intoxicação ocorre com valores de 10^5 a 10^6 ufc g^{-1} no alimento, com pH maior que 5 (CARMO et al.,2002), no entanto, um estudo comprovou que estirpes de *S. aureus* a uma concentração de 10^3 ufc g^{-1} com uma produção baixa de enterotoxinas em meio de cultura são capazes de produzir quantidades suficientes para gerar intoxicação em alimentos após 24 horas de incubação a 25°C (PEREIRA et al.,1997). Já em estudos relacionados com queijos Minas artesanais em três regiões do estado de Minas Gerais, não detectou-se a presença de enterotoxina apesar de que a contagem de *S. aureus*, em algumas situações, tenha sido superior a 10^7 ufc g^{-1} (PINTO et al., 2004; PINTO, 2004 e ARAÚJO, 2004). O leite cru por possuir uma microbiota diversificada, com predomínio de bactérias lácticas, provavelmente promove uma proteção natural inerente ao sistema vivo (PINTO et al., 2004). Estudo com queijos artesanais de diversas partes do mundo indicam efeito antagonista de bactérias lácticas sobre *S. aureus*. (NUÑEZ et al., 1986).

2.6.1.2. Coliformes a 30°C e Coliformes 45°C

Também conhecidos como coliformes totais, o grupo de coliformes a 30°C inclui as bactérias na forma de bastonetes gram-negativos, não-esporogênicos, aeróbios ou anaeróbios facultativos, capazes de fermentar a lactose com produção de gás, em 24 a 48 horas a 35° C. O grupo de coliformes 30°C inclui cerca de 20 espécies, dentre as quais encontram-se os gêneros *Escherichia*, *Enterobacter*, *Citrobacter* e *Klebsiella* (APHA, 2001). A definição dos coliformes a 45°C, também conhecidos como coliformes fecais ou termotolerantes, é a mesma, porém a temperatura para a

fermentação da lactose e produção de gás é em torno de 44,5 °C a 45,5 °C (SILVA et al., 1997).

A definição de coliformes fecais objetivou, em princípio, selecionar apenas os coliformes originários do trato gastrointestinal de humanos e de animais de sangue quente. E inclui pelo menos três gêneros: *Escherichia*, *Enterobacter* e *Klebsiella* (JAY, 2005 e SILVA et al., 1997). Atualmente, sabe-se que algumas cepas de *Enterobacter* e *Klebsiella* não são de origem fecal, por esse motivo, a determinação de coliformes 45°C em alimentos é menos representativa como indicação de contaminação fecal do que a enumeração direta de *Escherichia coli*, embora possa ser introduzida nos alimentos a partir de fontes não-fecais (SILVA et al., 1997).

Muitas estirpes de *E. coli* são comprovadamente patogênicas para o homem e os animais, podendo causar gastroenterites agudas, principalmente em crianças. FRANCO e LANDGRAF (1996), com base em fatores de virulência, manifestações clínicas e epidemiologia, dividiu as cepas de *E.coli* patogênicas em cinco classes: EPEC (*E. coli* enteropatogênica clássica); EIEC (*E. coli* enteroinvasiva); ETEC (*E. coli* enteroxigênica); EHEC (*E. coli* entero-hemorrágica); e EAaggEC (*E. coli* enteroagregativa).

A presença de *E. coli* em leite pode estar associada à contaminação fecal e o consumo de leite cru é a principal causa dos casos documentados da infecção (VANETTI, 2003).

2.6.1.3. *Listeria* sp.

O gênero *Listeria* é amplamente distribuído na natureza e pode ser encontrado em solos e fezes humanas ou de outros animais. São bastonetes curtos, gram-positivos, móveis a 25°C e imóveis a 35°C, com flagelos peritríquios, não formam esporos e apresentam reações de catalase e oxidase positivas. A espécie patogênica é *Listeria monocytogenes*, sendo os alimentos os principais veículos. Uma importante característica desta espécie é a capacidade de multiplicar-se em temperaturas de refrigeração, entre 2 °C a 4°C e pode sobreviver por mais de 100 dias a 4°C. São capazes de se multiplicar em intervalos de temperatura entre 2,5°C e 44°C, em concentrações entre 10,5% e 30,5% de NaCl. O intervalo de pH ótimo é de 6 a 8, mas essa espécie

pode crescer entre 5 e 9. Pode se desenvolver em alimentos com Aw baixa (0,83) (JAY, 2005).

Listeria monocytogenes caracteriza-se por ser patogênica, principalmente, para indivíduos imunologicamente debilitados, como crianças e idosos. Em mulheres grávidas, pode ocorrer aborto, parto prematuro ou septicemia neonatal (MARCO et al., 2000; MARTÍN et al., 2004). Os sintomas mais comuns são febre, fadiga, mal-estar, náusea, vômitos, dores e diarreia (FRANCO e LANDGRAF, 1996).

O uso de leite cru na fabricação de queijos levanta particular interesse na saúde pública devido à possibilidade de incidência de *Listeria monocytogenes* (PINTADO et al., 2005). As legislações estaduais e federais exigem ausência deste patógeno em 25g de amostra de queijo. De acordo com SILVA et al., (1998) existem poucos estudos sobre *L. monocytogenes* em queijos fabricados no Brasil e as informações sobre ocorrência de casos clínicos ou surtos de listeriose associados ao consumo de algum alimento, são escassas. MARTINS (2006), PINTO (2004) e ARAÚJO (2004) não encontraram *Listeria* sp. em nenhuma das amostras de queijos Minas artesanais analisadas nas regiões do Serro e Araxá. Entretanto, ORNELLAS (2005) confirmou a incidência de 2,5% em queijos artesanais por este microrganismo. Resultados semelhantes foram encontrados por OLIVEIRA (1993), CORDANO e ROCOURT (2001) e PAK et al., (2002) em outros tipos de queijos.

2.6.1.4. *Salmonella* sp.

O gênero *Salmonella* representa um grupo de bactérias, cuja maioria infecta uma ampla classe de animais e humanos e está disseminada em países de clima tropical e subtropical, constituem uma das doenças mais importantes causadas pelo consumo de alimentos, causando no homem desordem intestinal e febre por dois a três dias (SILVA e GOMES, 2001; JAY, 2005). São bacilos gram-negativos, não esporulados, aeróbios facultativos, catalase positiva, oxidase negativa, em geral são móveis com flagelos peritríquios. O pH ótimo de crescimento está próximo a neutralidade, mas crescem a pH entre 4 e 9. A temperatura de crescimento está entre 7°C e 47°C (ótima entre 35°C e 37°C) e Aw mínima para crescimento de 0,94 (MENDONÇA et al., 2003; JAY, 2005).

As doenças causadas por *Salmonella* subdividem-se em três grupos: a febre tifóide, causada por *Salmonella typhi*, as febres entéricas, causadas por *Salmonella*

paratyphi (A, B e C) e as salmoneloses, causadas pelas demais salmonelas. Geralmente os sintomas são caracterizados por diarreia, febre, dores abdominais e vômitos, aparecendo após 12 a 36 horas depois do contato com o microrganismo, que permanece entre um e quatro dias (FRANCO e LANDGRAF, 1996). Entre os alimentos que mais apresentam o risco a esta patogenicidade encontram-se os ovos, carnes de aves, produtos cárneos processados e produtos lácteos (MENDONÇA et al., 2003).

A legislação brasileira exige ausência de *Salmonella* em 25g de amostra de produtos lácteos e em outros produtos. Em estudos com queijos artesanais, PINTO (2004) e ORNELLAS (2005) não encontram a presença de *Salmonella* nas amostras de queijos analisadas. Enquanto que ARAÚJO (2004), em trabalhos realizados com queijos Minas artesanais da região de Araxá, encontrou *Salmonella* sp. em 7 das 37 amostras analisadas. MARTINS, (2007) encontrou a presença de *Salmonella* sp. em uma das oito amostras de queijos artesanais da região do serro e FEITOSA et al., (2003) encontraram em queijos Coalho e Manteiga a presença de *Salmonella* sp. em 9% e 15% das amostras analisadas, respectivamente.

2.6.2. Microscopia de Alimentos

A microscopia de alimentos é uma área do controle de qualidade que tem por objetivo pesquisar a presença de matérias estranhas ou evidenciar fraudes, verificando a qualidade da matéria-prima e as condições higiênicas sanitárias empregadas no processo de fabricação e armazenamento dos produtos alimentícios (CORREIA e RONCADA, 1997). Por meio da microscopia são identificados os elementos histológicos vegetais e animais dos alimentos, que permite a detecção de fraudes acidentais ou intencionais. As condições higiênicas são também determinadas pela pesquisa de matérias estranhas, sujidades leves e pesadas presentes no produto (MARTINI et al., 2004).

2.6.2.1. Material estranha

Material estranho é qualquer material não pertencente ao produto, que seja associado às condições ou práticas inadequadas de produção, estocagem ou distribuição, incluindo sujidades, leves, pesadas e as separadas por peneira, material em decomposição como tecidos podres, em função de causas parasíticas ou não-parasíticas

e materiais diversos como areia, terra, vidro, ferrugem entre outros excluindo a contaminação bacteriana (A. O. A. C. ,1984).

2.6.2.2. Sujidades

As sujidades podem ser definidas como quaisquer materiais indesejáveis presentes no produto, cuja origem é a contaminação por animal (roedores, insetos ou pássaros) ou ainda material indesejado proveniente de condições sanitárias impróprias de manuseio (A. O. A. C., 1984). São divididas em:

Sujidade pesada: formada por material mais pesado, separado do alimento por sedimentação, baseando-se na diferença de densidade entre sujidade e as partículas do alimento em imersão em líquidos como o clorofórmio, tetracloreto de carbono, etc. Exemplos: excrementos e fragmentos de insetos ou roedores, areia e terra.

Sujidades leves: são partículas de sujidades mais leves, lipofílicas e são separadas do produto por filtração em uma mistura líquida de óleo-água. Exemplos: fragmentos de insetos, insetos inteiros, pêlos de roedores e bárbulas de penas.

O leite é um alimento bastante susceptível a presença de material estranho, que pode ocorrer desde o momento em que este é extraído do úbere do animal, até o destino final deste, seja ele consumo direto ou processado. Em países como o Brasil, onde os cuidados com a ordenha deixam muito a desejar, os hábitos higiênicos de manipuladores, do animal que está sendo ordenhado e das instalações, são fundamentais para se evitar a contaminação do produto (BORSARI, 2001).

MARTINS et al., (2003) analisando a qualidade microscópica de leite fluido comercializado na região da Zona da Mata mineira, observou que cerca de 76% e 83% das amostras fiscalizadas pelo SIF e pelo SIM, respectivamente, seriam condenadas pela Instrução Normativa nº 51/2002, do Ministério da Agricultura e Abastecimento que estabelece ausência de qualquer matéria estranha em leite. E 100% das amostras

sem fiscalização também apresentaram matéria estranha (tecido, matéria terrosa, plástico, pêlo bovino, etc.).

Vários estudos têm sido realizados para verificar as qualidades microscópicas em queijos. SILVA et al., (2003), analisando as qualidades microscópicas de queijos Minas frescal comercializados na Zona da Mata Mineira, observou que todas as amostras apresentaram matéria estranha e sujidades. PIMENTEL FILHO et al., (2005) encontraram 814 matérias estranhas presentes em queijos Minas artesanais fabricados na região do Alto Paranaíba, entre elas, 8% era relativo a pêlos humanos e os 92% restantes eram bárbulas, insetos, areia e outros. Em outro trabalho PIMENTEL FILHO et al., (2006), encontraram cerca de 2.109 materiais estranhos em queijos artesanais comercializados na região do Serro, sendo os mais relevantes, material terroso (707), elementos histológicos vegetais (313), 30 pêlos de animais (cão, bovino, rato), pêlos humanos (34), fragmentos de madeira (22) e de insetos (3).

3. MATERIAL E MÉTODOS

O presente trabalho foi realizado nos laboratórios de Culturas Lácticas e Laboratório de Análises Físico-químicas de Leite e Derivados do Departamento de Tecnologia de Alimentos da Universidade Federal de Viçosa (UFV) e no Laboratório de enterotoxina da Fundação Ezequiel Dias (FUNED)

3.1. Coleta e Manutenção das Amostras

As amostras de queijo Minas artesanal foram coletadas diretamente nas unidades produtoras em dois períodos do ano, período das águas no mês de maio de 2006 e período da seca no mês setembro de 2006. Foram escolhidas aleatoriamente 8 propriedades na região de Medeiros (MG), de acordo com uma listagem fornecidas pelo IMA e EMATER envolvendo unidades produtoras em diferentes graus de adequação de modo a contemplar queijos com diferentes graus de contaminação.

Após 2 dias de fabricação, ao completar a salga, os queijos foram coletados nas propriedades de origem e transportados para a Universidade Federal de Viçosa, onde, foram maturados na condição ambiente e sob refrigeração antes de serem analisados nos tempos pré-determinados de 8, 15, 22 , 29, 36 e 64 dias de maturação. Antes do armazenamento nas temperaturas indicadas os queijos que foram armazenados sob refrigeração foram lavados e embalados à vácuo. Os queijos armazenados à temperatura ambiente, não foram embalados, foram lavados e virados, a cada dois dias, conforme protocolo observado nas unidades produtoras destes queijos.

3.2. Condições de Maturação

As médias de temperatura e umidade relativa (UR) de armazenamento dos queijos durante o período de maturação foram às seguintes:

a) Período das águas:

- Maturação ambiente: 27°C e 68% (UR);
- Maturação em câmara fria: 8°C e 77% (UR).

b) Período da seca:

- Maturação ambiente: 23°C e 62% (UR);
- Maturação em câmara fria: 8°C e 75% (UR).

Durante a maturação na condição ambiente, os queijos foram armazenados em um armário metálico, com tela nas laterais para ventilação e prateleiras forradas com papel alumínio (Figura 06). Os queijos maturados sob refrigeração foram armazenados sobre uma prateleira de fibra de vidro em câmara fria (Figura 07).

Semanalmente uma unidade de cada queijo por produtor e de cada condição de temperatura foi retirada do acondicionamento e submetida às análises microbiológicas e físico-químicas. As análises microbiológicas dos queijos artesanais foram realizadas momentos antes das análises físico químicas.



Figura 06 – Queijo Canastra mantidos a temperatura ambiente em armários metálicos.



Figura 07– Queijo Canastra mantidos a temperatura de refrigeração em prateleira de fibra de vidro em câmara fria.

3.3. Análises microscópicas

3.3.1. Preparo das amostras

Empregou-se a técnica da hidrólise ácida, seguida de filtração. Primeiramente foram observadas as características externas de todas as amostras, seguindo-se pesagem de

225g de cada amostra e corte em cubos de, aproximadamente, 6 mm. Foram adicionados 100 mL de H_3PO_4 (1 + 40) fervente, em béquer seguindo-se homogeneização lenta por 15 minutos até total dispersão dos grumos de queijo. O conteúdo foi filtrado em papel Whatman N.º 4, sob vácuo (funil Buchner). Para facilitar a filtração, embora não sugerido pela metodologia oficial, foram utilizados 800 mL de água destilada fervente. Em algumas amostras adicionou-se álcali diluído (NaOH 3% em água) até total recuperação de toda sujidade nos filtros (AOAC, Ref. 96.049,1995).

3.3.2. Leitura dos Filtros

O material nos filtros (até 6 por amostra), foi examinado ao microscópio estereoscópio com aumento de 10 a 40 vezes, e visualizado em um monitor acoplado. As sujidades não identificadas foram separadas e preparadas em lâminas para visualização em microscópio ótico (100 X) sendo comparados com amostras padrões do Laboratório de análises físico-químicas da Universidade Federal de Viçosa. O material estranho encontrado foi quantificado e caracterizado de acordo com a sua categoria e foram considerados como material estranho, i) elemento histológico vegetal, como células vegetais, capim (braquiária e grama pernambucana), canas e folhas; ii) pontos escuros como fragmentos de ardósia, fragmentos metálicos e partículas de poeira; iii) fragmento de insetos (parte de carapaça de barata, perna de mosquito); iv) fragmentos de madeira; v) material terroso / pontos marrons como ferrugem e areia; vi) pêlo como bovino, rato, cão e pêlos humano e vii) fragmentos de tecidos como algodão, nylon e linho. As amostras foram analisadas com oito dias de fabricação nos dois períodos de coleta, período das águas e da seca.

3.4. Análises físico-químicas

3.4.1. pH pelo método potenciométrico (FIL – IDF, 115a, 1989);

A determinação do pH do queijo artesanal foi feita utilizando-se medidor de pH modelo Tecnal, pH Meter Tec-2, introduzindo-se eletrodo específico para queijos na parte interna.

3.4.2. Determinação de umidade (BRASIL, 2003);

A umidade é determinada pela perda de massa em condições nas quais, água e substâncias voláteis são removidas. O resíduo obtido após evaporação representa os sólidos totais da amostra. O resultado é obtido a partir da fórmula abaixo:

$$\% \text{ umidade} = \frac{100 \times m}{m'}$$

$$\% \text{ sólidos totais} = 100 - \% \text{ umidade}$$

Onde:

m = perda da massa, em gramas; e

m' = massa da amostra, em gramas.

3.4.3. Determinação da atividade de água

A atividade de água do queijo foi obtida mediante a fórmula de ESTEBAN e MARCOS, a qual correlaciona teor de sal e sal na umidade do queijo: $A_w = 1 - 0,033 M$. Sendo M = molalidade do NaCl.

3.4.4. Teor de gordura (BRASIL, 2003);

Esta análise baseia-se no ataque seletivo da matéria orgânica por meio de ácido sulfúrico, com exceção da gordura que será separada por centrifugação, auxiliada pelo

álcool amílico, que modifica a tensão superficial. O resultado é dado em % de gordura, diretamente na escala do butirômetro.

3.4.5. Determinação de gordura no extrato seco

O teor de gordura no extrato seco foi determinado indiretamente por meio da fórmula abaixo (PEREIRA *et al.*, 2001):

$$\%GES = \frac{\%Gd}{\%ES} \times 100$$

Sendo:

%GES: teor de gordura no extrato seco, em % (m/m);

%Gd: teor de gordura na amostra em %; e

%ES: teor de extrato seco desengordurado na amostra da amostra em %.

3.4.6. Teor de Cloreto de Sódio

Esta análise baseia-se na reação do nitrato de prata com os cloretos em presença de cromato de potássio como indicador, até a mudança de coloração de amarelo para marron. O resultado é expresso em % NaCl e é dado pela fórmula abaixo (PEREIRA, et al., 2003):

$$\%NaCl = \frac{(A - B) \times Ci \times fc \times 5,845}{g}$$

Sendo:

% NaCl: teor de cloreto de sódio em %;

A: volume da solução de tiocianato de potássio gasto na titulação da amostra;

B: volume da solução de tiocianato de potássio gasto na titulação da prova em branco;

Ci: concentração da solução de tiocianato de potássio, em mol/L;

Fc: fator de correção da solução de tiocianato de potássio; e

g: massa da porção alíquota da amostra ($1,17/100 \times 50 = 0,5845$).

3.4.7. Ácido láctico (BRASIL, 2003);

Esta técnica baseia-se na extração de ácidos graxos livres solúveis com água a 40°C e neutralizados até o ponto de equivalência, com solução alcalina de concentração conhecida, utilizando-se como solução indicadora a fenolftaleína 1%. O resultado é expresso em % de ácido láctico e dado pela fórmula:

$$\% \text{ em ácido láctico} = \frac{V \times f \times 0,9}{m}$$

Sendo:

V = volume da solução de hidróxido de sódio 0,1 N gasto na titulação, em mL;

f = fator de correção da solução de hidróxido de sódio 0,1 N; e

m = massa da amostra na alíquota, em gramas.

3.4.8. Proteína pelo método Kjeldhal

A proteína total (PT) foi determinada de modo indireto multiplicando-se o percentual de nitrogênio total (NT) pelo fator 6,38, indicando para proteína derivada de leite (SILVA e QUEIROZ, 2005).

3.4.9. Extensão de maturação

A extensão de maturação (EM) foi calculada indiretamente por meio da razão entre a percentagem de nitrogênio solúvel em pH 4,6 (NS pH 4,6) e nitrogênio total (NT), multiplicando resultado por 100 (WOLFSCHOON-POMBO, 1983).

$$EM = \frac{NS \text{ (pH 4,6)}}{NT} \times 100$$

3.4.10. Profundidade de maturação

A profundidade de maturação (PM) foi quantificada de forma indireta por meio da razão entre a percentagem de nitrogênio solúvel em TCA 12% (NS TCA12%) e nitrogênio total (NT), multiplicando-se o resultado por 100 (WOLFSCHOON-POMBO, 1983).

$$PM = \frac{(NS \text{ TCA } 12\%)}{NT} \times 100$$

3.5. Análises Microbiológicas

3.5.1. Preparo da amostra

Para o preparo do homogenato, 25g de queijo de todas as amostras foram diluídas em 225mL de água peptonada esterelizada 2% e posteriormente homogeneizadas em um *Stomacher*, por 1 minuto. Foram feitas diluições decimais e em seguida os plaqueamentos em duplicata para cada diluição.

3.5.2. Coliformes Totais e *Escherichia coli*

Para a contagem de Coliformes Totais e *E. coli*, utilizou-se o método Petrifilm Coliformes/*E.coli* (Contagem de Coliformes e *E. coli* em Alimentos, Película Reidratável Seca) de acordo com os procedimentos determinados pelo distribuidor (3M Microbiology).

3.5.3. Contagem Total de mesófilos aeróbios

A contagem total de mesófilos no queijo artesanal foi feita pelo método de plaqueamento em profundidade, em placas de petri, utilizando-se o meio de cultura, Ágar Padrão para Contagem – PCA (Merck). Utilizou-se de 4 a 5 diluições, de acordo com o grau de contaminação da amostra. Os plaqueamentos foram realizados em duplicata. Após a solidificação, as placas foram invertidas e incubadas em estufas

incubadoras a 35°C, por 48 horas. Após a incubação as placas foram contadas e os resultados foram expressos em ufc g⁻¹ (APHA, 2001).

3.5.4. Contagem de *Staphylococcus aureus*

Para as análises de *S. aureus*, utilizou-se o Petrifilm 3M – Rapid *S. aureus* (RSA) Count Plate, de acordo com os procedimentos determinados pelo distribuidor, sendo este indicado para as análises de queijos (PONSANO et al., 2000; SCHOELLER e INGHAM, 2001).

Fez-se análise de enterotoxinas em 16 amostras de queijo utilizando-se duas metodologias diferentes. A primeira foi o teste qualitativo imunoenzimático: Vidas Staph Enterotoxin (SET, 30701, Bio Merieux, Marcy-Létoile, França), de acordo com instrução do fabricante, que permite a detecção simultânea de sete diferentes enterotoxinas (SEA, SEB, SEC, SEC1, SEC2, SEC3, SED, SEE). A segunda metodologia foi o método OSP (Detecção de Sensibilidade Ótima em Placas, para quatro tipos de enterotoxina SEA, SEB, SEC E SED (Robbins et al., 1974).

3.5.5. Pesquisa de *Listeria sp.* e *Salmonella sp.*

Para as análises de *Salmonella sp.* no queijo, utilizou-se o Reveal - *Salmonella* Test System (AOAC Licença 960801) de acordo com os procedimentos determinados pelo distribuidor (Neogen® corporation). Para a detecção de *Listeria sp.* no queijo, utilizou-se o Teste Reveal para *Listeria* (AOAC Licença 960701) de acordo com os procedimentos determinados pelo distribuidor (Neogen® corporation).

3.6. Delineamento Experimental

O experimento foi realizado no esquema fatorial, considerando-se o delineamento em blocos casualizados, com oito repetições, formado por cada produtor de queijo. Os fatores foram à condição de armazenamento, ambiente e refrigerado e os tempos de maturação de 8, 15, 22, 29, 36 e 64 dias. Este experimento foi realizado em

dois períodos de coleta, águas e seca. Os parâmetros físico-químicos e microbiológicos foram submetidos à análise de variância (GOMES, 1987). Quando necessário, foi realizada a análise de regressão em função do período de maturação, os coeficientes de regressão foram testados pelo teste “t” ao nível de 5% de significância.

Com o objetivo de verificar a similaridade entre as condições de armazenamento combinados nas épocas de fabricação dos queijos, foi construído um dendrograma com base no método hierárquico de ligação simples e na distância euclidiana dos dados padronizados de todas as médias dos fatores físico-químicos e microbiológicos.

Todas as análises estatísticas foram realizadas com o auxílio do programa *Statistical Analysis System* (SAS institute, 2003)

Para avaliar os resultados microscópicos das 16 amostras utilizou-se uma análise estatística descritiva.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Características Microscópicas

Na Tabela 3 está indicado as médias das contagens de materiais estranhos encontrados nos queijo Canastra no período das águas e no período da seca.

O coeficiente de variação (CV) é uma avaliação da instabilidade relativa dos resultados, sendo a razão entre o desvio padrão e a média, multiplicando-se o resultado por 100. Os resultados obtidos estão dentro de uma faixa de variação normal, a partir do momento que os coeficientes de variação das contagens microscópicas observados apresentarem na maioria, valores de até 30%, o que é considerado normal, segundo SAMPAIO (1998) para respostas obtidas na área biológica. As únicas variáveis que apresentaram o CV abaixo de 30% foram às contagens de pontos escuros no período das águas e as contagens de pêlos humanos no período da seca. Essa baixa precisão pode ser associada à baixa similaridade entre os produtores em um dado parâmetro (Apêndice D), e a falta de padronização, que pode levar a contaminação em várias etapas distintas no processo de fabricação.

De acordo com os resultados, em todas as amostras analisadas encontram a presença de material estranho, sendo que no período das águas a contagem de material estranho presente foi 41,3% menor que no período da seca (Tabela 3). De acordo com MARTINS (2006), que também encontrou resultados semelhantes, explica que esse resultado pode ser conseqüência da grande quantidade de material suspenso no ambiente, carregado principalmente pelo vento.

Tabela 3 – Médias, desvios padrões e coeficientes de variações das contagens de material estranho encontrado nos queijo Canastra, no período das águas e da seca.

Tipos de material estranho	Período das águas		Período da seca	
	X±S*	CV**	X±S*	CV**
Elemento histológico vegetal	23,38 ±7,29	31,18	39,75 ± 17,58	44,23
Pontos escuros	73,00 ±19,64	26,90	92,00 ± 30,69	33,36
Fragmento de insetos	0,50 ±0,76	151,19	1,38 ± 1,69	122,55
Fragmento de madeira	1,50 ±1,20	79,68	4,13 ± 1,36	32,88
Material terroso / pontos marrons	31,25 ±15,15	48,49	74,75 ± 28,03	37,50
Pêlo bovino / rato / cão	1,38 ±0,92	66,63	6,38 ± 3,46	54,30
Pêlo humano	1,75 ±1,39	79,36	4,13 ± 1,13	27,30
Fragmentos de tecidos	3,38 ±1,77	52,38	9,38 ± 4,72	50,33

*Média ± desvio padrão

**Coeficiente de variação = (desvio padrão/média) x 100

Os pontos escuros no período das águas é um dos principais responsáveis pela grande quantidade de material estranho encontrado nos queijos e pode ser resultado de uma obtenção do leite em condições insatisfatórias de higiene e equipamento e utensílios em condições de uso inadequados, que podem trazer fragmentos de equipamentos como, por exemplo, a ardósia que por se tratar de um material poroso, facilita a penetração do soro ácido, que pode acabar desfragmentando com o tempo (MARTINS, 2006). No período da seca, um dos responsáveis pelo número elevado de material estranho nos queijos foram o material terroso e os pontos marrons, o que confirma a grande quantidade de partículas suspensa no ambiente devido à baixa umidade relativa do ar, carregada pelo vento.

De maneira geral, os dados de microscopia encontrados apresentaram uma grande amplitude de variação (Tabela 3). O que pode ser explicado também pela ausência de padronização e higiene no processo de fabricação do queijo Canastra. Os valores máximo, mínimo e amplitude de variação dos resultados encontrados neste estudo estão apresentados na Tabela 4.

Fragmentos de madeira foram encontrados em 100% das amostras analisadas no período da seca e em 75% das amostras analisadas no período das águas. A presença de fragmentos de madeira nos queijos pode ser associada à utilização de utensílios e equipamentos de madeira na sua fabricação, como pás e mesas. Além destas

possibilidades, o carreamento de fragmentos de madeira nos pêlos das vacas e pelo vento podem de certa forma entrar em contato com o leite que será utilizado na fabricação do queijo.

Fragmentos de tecidos estiveram presentes em 100% das amostras analisadas, variando de 2 a 7 unidades no período das águas e de 5 a 20 unidades no período da seca, não havendo grande diferença entre os dois períodos analisados (Tabela 4). A presença deste material nas amostras de queijo pode ser devido ao uso de tecidos de fácil desfragmentação como o algodão e ao seu uso ininterrupto para a filtração do leite e enformagem do queijo, não havendo uma periodicidade mínima de troca dos mesmos.

Tabela 4 – Valores máximo, mínimo e amplitude de variação encontrados para os parâmetros microscópicos do queijo da Canastra coletados no período das águas e da seca.

Tipos de material estranho	Período das águas			Período da seca		
	Valor Max.	Valor Mín.	AV*	Valor Máx.	Valor Mín.	AV*
Elemento histológico vegetal	35	12	23	65	17	48
Pontos escuros	101	51	50	140	54	86
Fragmento de insetos	2	0	2	5	0	5
Fragmento de madeira	3	0	3	6	2	4
Material terroso / pontos marrons	55	15	40	120	30	90
Pêlo bovino / rato / cão	3	0	3	12	3	9
Pêlo humano	5	1	4	6	3	3
Fragmentos de tecidos	7	2	5	20	5	15

*Amplitude de variação = Valor máximo – valor mínimo

Em todas as amostras foram constatadas a presença de pêlo bovino ou de rato ou de cão, com exceção de um produtor no período das águas. A variação foi de 1 a 3 unidades no período das águas e de 3 a 4 unidades no período da seca. O pêlo humano foi encontrado em 100% das amostras analisadas variando de 1 a 5 unidades no período das águas e de 3 a 6 unidades no período da seca.

Na Figura 08 é apresentado o gráfico com a contagem total de material estranho encontrados nos dois períodos de fabricação. Como foi mencionado anteriormente, a contagem de material estranho no período das águas foi muito inferior á contagem no

período da seca, essa diferença pode estar associada a maior quantidade de material suspenso no ambiente e a baixa umidade relativa do ar.

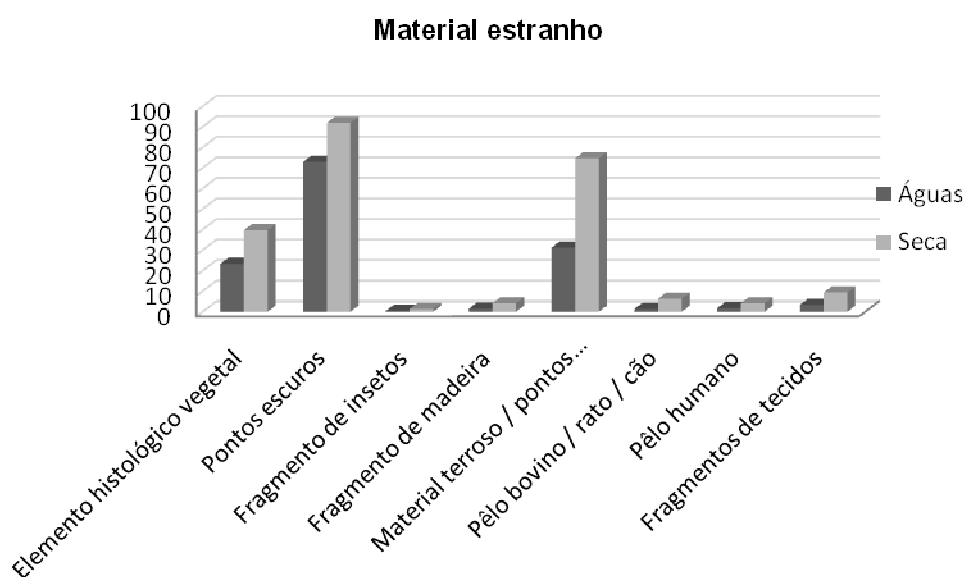


Figura 08 - Quantidade de material estranho encontrado no queijo Canastra nos períodos da seca e das águas.

Diante desses resultados, e do perigo, principalmente microbiológico que esses materiais estranhos podem carrear, faz-se necessário a implantação de boas práticas agropecuárias nas queijarias responsáveis pelo processo de fabricação desses queijos, além de uma legislação específica para queijos artesanais levando-se em consideração o modo artesanal e único de produção desses queijos.

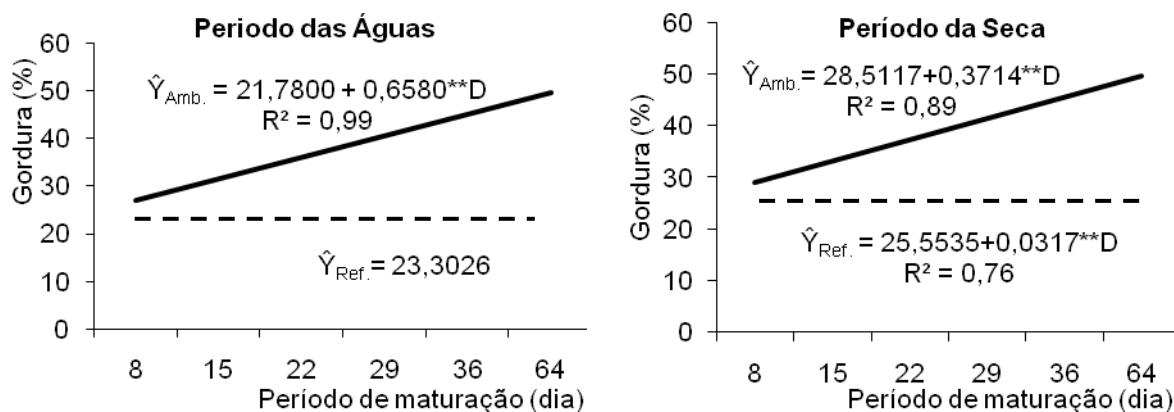
4.2. Características físico-químicas dos queijos Minas artesanais da região da Serra da Canastra.

De acordo com os resultados, todas as amostras maturadas a temperatura ambiente foram influenciadas ($P < 0,01$) pelo tempo de maturação em relação às variáveis físico-químicas analisadas, independente do período de fabricação e armazenamento (águas e seca). Nos queijos acondicionados a temperatura de refrigeração, o tempo de maturação não casou efeito ($P > 0,01$) em nenhuma das variáveis analisadas em ambos os períodos de maturação, com exceção da gordura no extrato seco (GES), nitrogênio solúvel (NS) em pH 4,6, NS em TCA 12% e gordura no

período da seca. O fato de queijos refrigerados, não terem sido influenciados ao longo da maturação pode estar relacionado ao processo de embalagem a vácuo desses queijos, conservando seu conteúdo de umidade e as baixas temperaturas o que diminui a velocidade das reações enzimáticas.

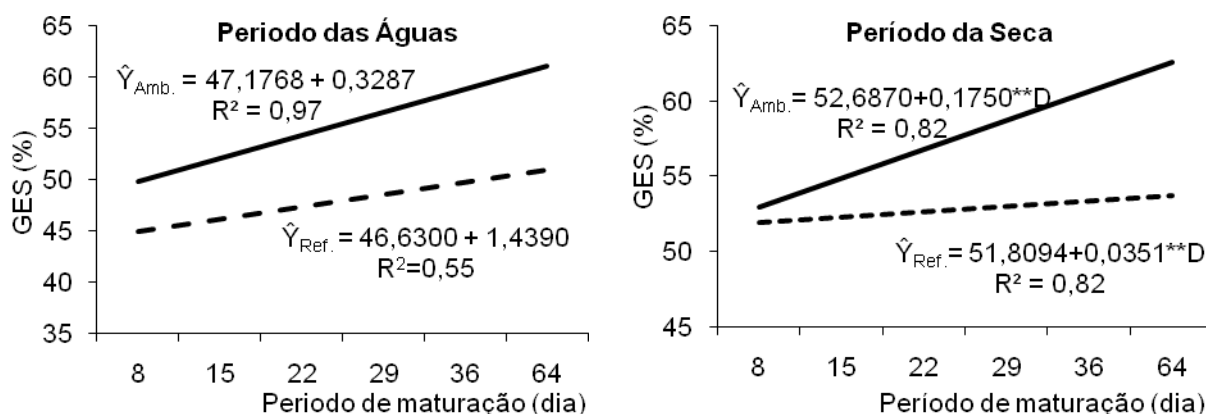
No período das águas e no período da seca, os queijos maturados na condição ambiente apresentaram aumento ($P < 0,01$) do teor de gordura e GES ao longo da maturação, assim como o teor de GES para os queijos maturados na temperatura de refrigeração. O teor de gordura para os queijos maturados a temperatura de refrigeração não foi influenciado ($P > 0,01$) ao longo do período de maturação (Figuras 09 e 10). As médias de GES dos queijos maturados na condição ambiente foram maiores do que os queijos maturados sob refrigeração, principalmente para aqueles fabricados no período da seca (Apêndice D). A gordura é um dos componentes do leite que mais sofre alteração, dependendo da estação do ano, alimentação animal e outros fatores. MARTINS (2006) ao acompanhar o período de maturação do queijo artesanal do Serro, encontrou resultados semelhantes aos encontrados neste trabalho.

A legislação federal (BRASIL,1996), classifica os queijos de acordo com o teor de gordura no extrato seco (GES), sendo denominados gordos quando apresentam um teor GES entre 45 a 59,9%, semi-gordos entre 25 a 44,9%, magros entre 10 e 24% e os desnatados com teores de GES abaixo de 10%. Enquanto que, a lei N°14.185/2002, específica para queijos artesanais, não estabelece nenhum critério para os queijos artesanais quando ao teor de gordura. Assim, de acordo com a legislação federal, todos os queijos analisados neste trabalho são classificados como gordos por possuírem valores de GES dentro dos padrões estabelecidos pela legislação, entre 45% e 59,9%, com exceção das amostras coletadas no período das águas e armazenadas sob refrigeração com 8 dias, que apresentou média de 43,08% de GES, sendo considerado semi-gordo (Apêndice B).



** Significativo pelo teste t (P<0,01).

Figura 09 - Teor de gordura dos queijos Canastra, em função do período de maturação (dia) para as diferentes condições de maturação, durante a coleta das amostras no período das águas e da seca. Amb = maturação na condição ambiente e Ref. = maturação na condição de refrigeração.

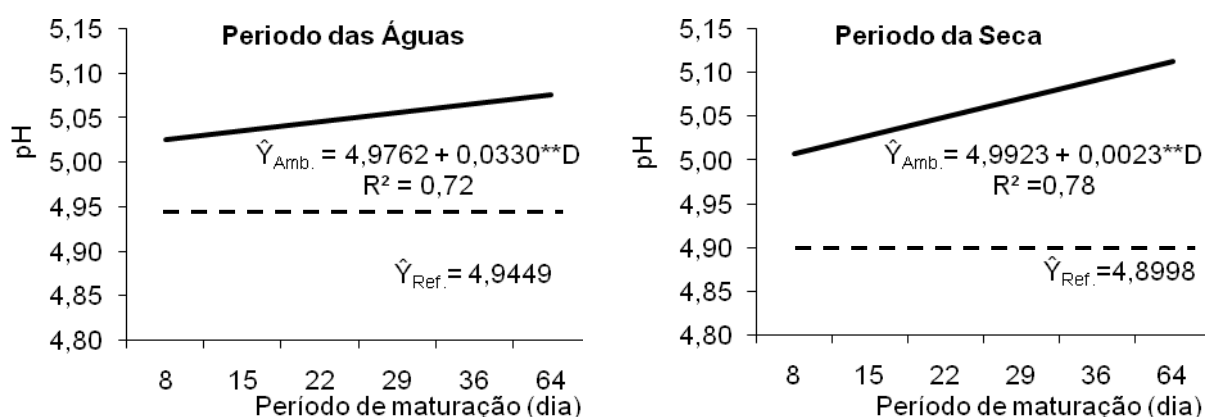


** Significativo pelo teste t (P<0,01).

Figura 10 - Teor de gordura no extrato seco do queijo Canastra, em função do período de maturação (dias) para as diferentes condições de maturação, durante a coleta das amostras no período das águas e da seca. Amb = maturação na condição ambiente e Ref. = maturação na condição de refrigeração.

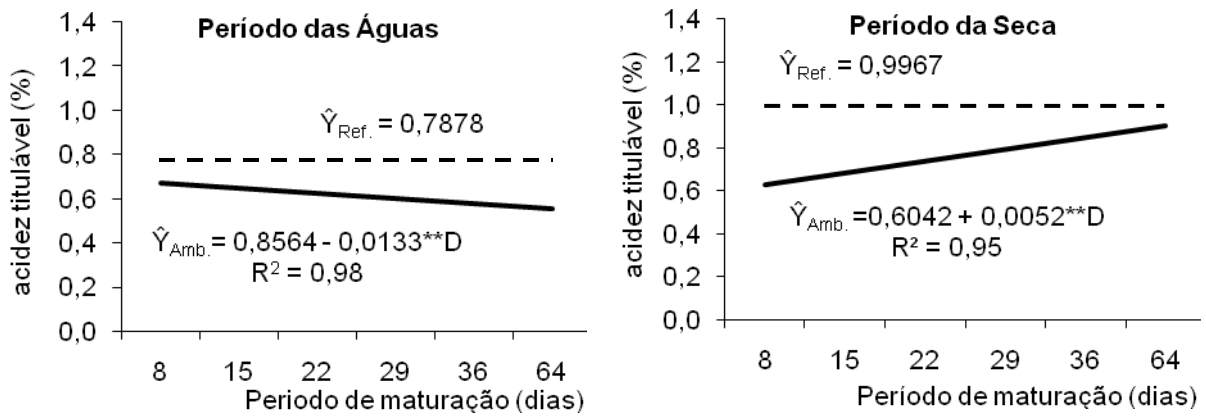
Independente do período de fabricação, os parâmetros de acidez titulável e pH, apresentaram interferência (P>0,01) do tempo de maturação a temperatura ambiente, enquanto que, os queijos maturados sob refrigeração, não apresentaram influência do tempo no aumento do pH e acidez (Figura 11 e 12), provavelmente, em função da

diminuição da velocidade das reações enzimáticas e metabólicas dos microrganismos, causadas pela baixa temperatura. No entanto, para os queijos maturados no período das águas, diferente do esperado, houve um decréscimo ($P < 0,01$) da acidez titulável presente ao longo da maturação, seguindo-se a tendência inversa do pH, o que contraria os resultados constatados por NARDES (2002) e MARTINS (2006). Segundo KOSIKOWISK (1977) e FURTADO (1997) a explicação se dá pelo fato do ácido láctico, na presença de cálcio, ser convertido em lactato de cálcio durante a maturação.



** Significativo pelo teste t ($P < 0,01$).

Figura 11- Teor do pH do queijo Canastra, em função do período de maturação (dias) para as diferentes condições de maturação, durante a coleta das amostras no período das águas e da seca. Amb = maturação na condição ambiente e Ref. = maturação na condição de refrigeração.



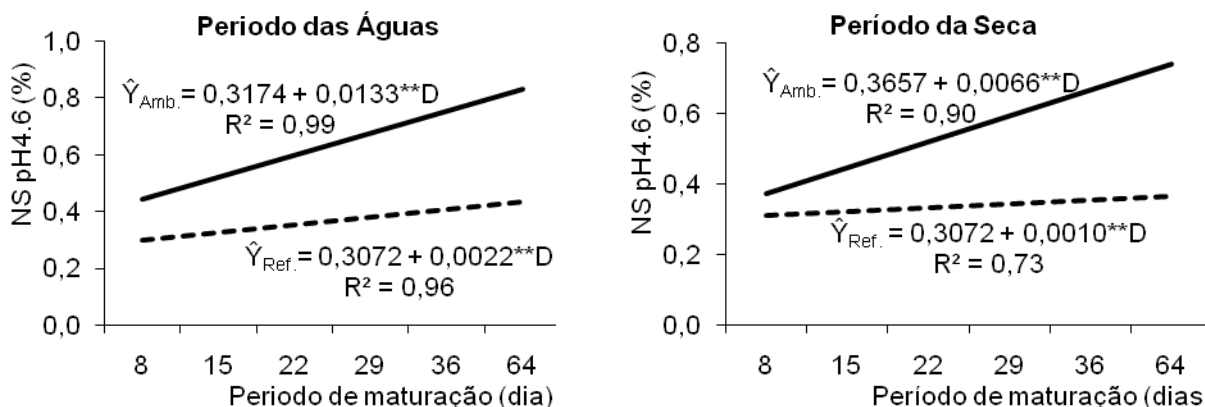
** Significativo pelo teste t ($P < 0,01$).

Figura 12 – Teor da acidez titulável dos queijos Canastra, em função do período de maturação (dias) para as diferentes condições de maturação, durante a coleta das amostras no período das águas e da seca. Amb = maturação na condição ambiente e Ref. = maturação na condição de refrigeração.

Os valores médios de pH dos queijos fabricados no período das águas foram ligeiramente mais altos do que os queijos fabricados no período da seca (Apêndice A). O aumento dos valores de pH durante a temperatura ambiente, pode estar relacionado a degradação protéica proveniente da atividade de proteases nativas do leite (plasmina) e daquelas presentes no “pingo” (fermento endógeno), com a formação de compostos nitrogenados alcalinos. A desaminação que ocorre na proteólise, a descarboxilação de aminoácidos e a dissociação de ácidos, principalmente o ácido láctico, são fatores que contribuem para o aumento do pH. Na maioria dos queijos este aumento é de apenas alguns décimos de pH.

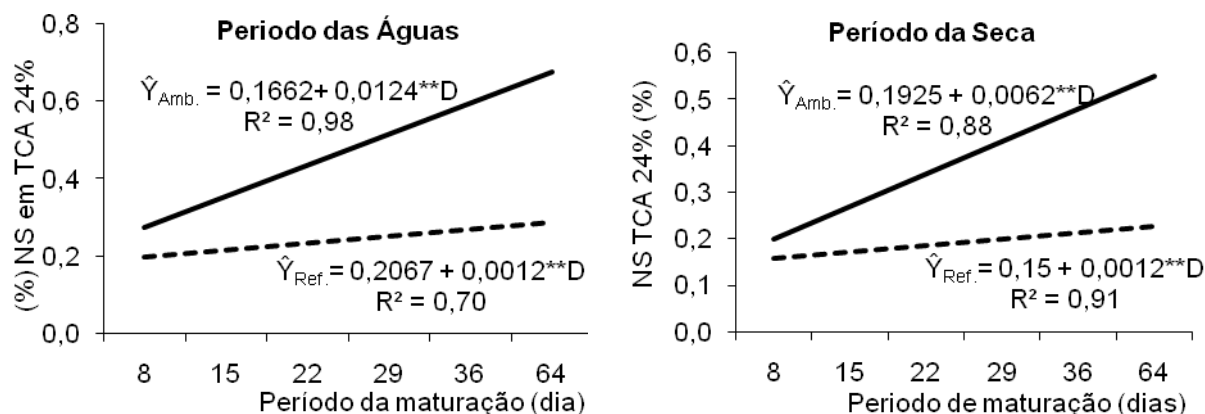
Os valores médios de nitrogênio total (NT), proteína total (PT), nitrogênio solúvel em pH 4,6, extensão de maturação, nitrogênio solúvel em TCA 12% e profundidade de maturação dos queijos artesanais da região da Serra da Canastra (Apêndice B e C) apresentaram as maiores médias para os parâmetros analisados, diferindo-se ($P < 0,05$) em relação aos queijos maturados em câmara fria. As diferenças encontradas entre as médias de NT e PT durante a maturação nas diferentes condições de temperatura, estão relacionadas não só com a perda de umidade do queijo durante o período de maturação (ambiente), que aumenta a concentração do teor de sólidos totais, mas também ao fato dos produtores de queijos Minas artesanais não utilizarem um sistema padronizado de alimentação animal, adotando-se desde o tratamento extensivo,

com uso exclusivo de pastagens, até o tratamento semi-intensivo, com algum tipo de suplementação, como concentrados e cana-de-açúcar.



** Significativo pelo teste t (P<0,01).

Figura 13 - Teor de nitrogênio solúvel em pH 4,6, dos queijos, em função do período de maturação (dias) para as diferentes condições de maturação, durante a coleta das amostras no período das águas e da seca. Amb = maturação na condição ambiente e Ref. = maturação na condição de refrigeração.

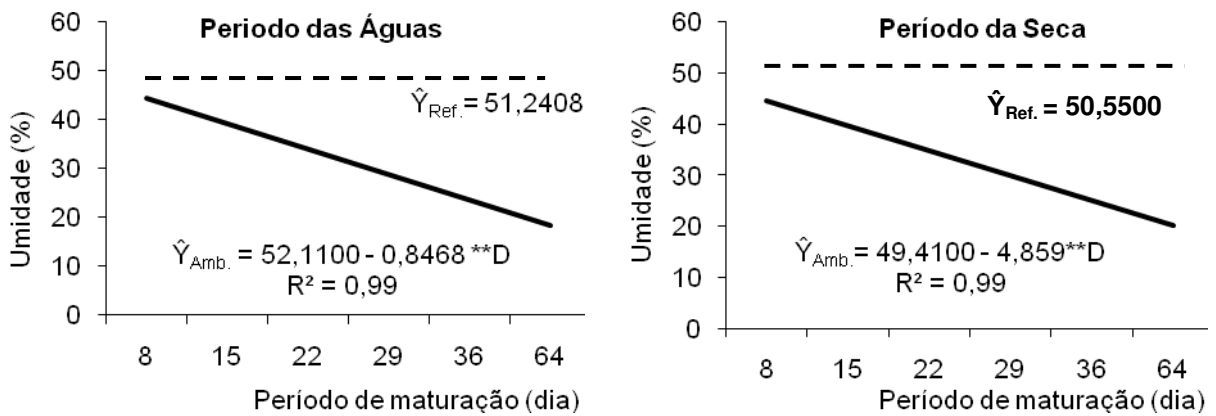


** Significativo pelo teste t (P<0,01).

Figura 14 - Teor de nitrogênio solúvel em TCA 12% dos queijos Canastra, em função do período de maturação (dias) para as diferentes condições de maturação, durante a coleta das amostras no período das águas e da seca. Amb = maturação na condição ambiente e Ref. = maturação na condição de refrigeração.

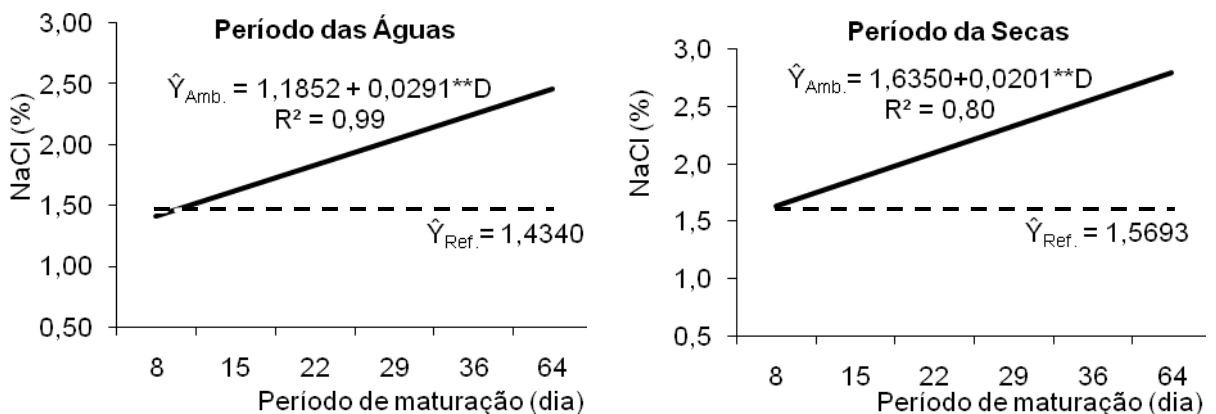
Os valores médios de NS em pH 4,6 e NS em TCA 12% apresentaram um aumento ao longo da maturação ($P < 0,01$), independente do período de fabricação e de temperatura de armazenamento. No entanto, para os queijos maturados à temperatura de refrigeração esses aumentos foram menos expressivos que a temperatura ambiente. Segundo EARLY (1998), a temperatura ambiente favorece a proteólise primária, representada pelos valores de NS em pH 4,6, sendo formada pela quebra das proteínas durante a maturação dos queijos envolvendo primeiramente a conversão da caseína em grandes peptídeos, devido principalmente a ação residual do agente coagulante sobre a α -s₁ e β -caseína o que intensifica a proteólise primária nos queijos. GRAPPIN e BEUVIER (1998), explica que as enzimas microbianas e aminopeptidases presentes no leite cru, são os principais responsáveis pela proteólise secundária, representada pelos valores de NS em TCA 12%. A temperatura exerce uma influência importante sobre o desenvolvimento microbiano e a produção de suas enzimas, onde o seu ótimo depende de cada grupo microbiano.

Durante toda a maturação a temperatura ambiente, tanto nas águas como na seca, o teor de umidade (UMD) (Figura 15), e atividade de água (A_w) (Figura 17) do queijo da Canastra diminuíram ($P < 0,01$) ao longo da maturação, enquanto que, na temperatura de refrigeração esses parâmetros não sofreram alterações ($P > 0,01$) com o tempo de maturação. Já o teor de cloreto de sódio (NaCl) aumentou ($P < 0,01$) ao longo da maturação ambiente e não teve ($P > 0,01$) influência do tempo para os queijos sob refrigeração (Figura 16).



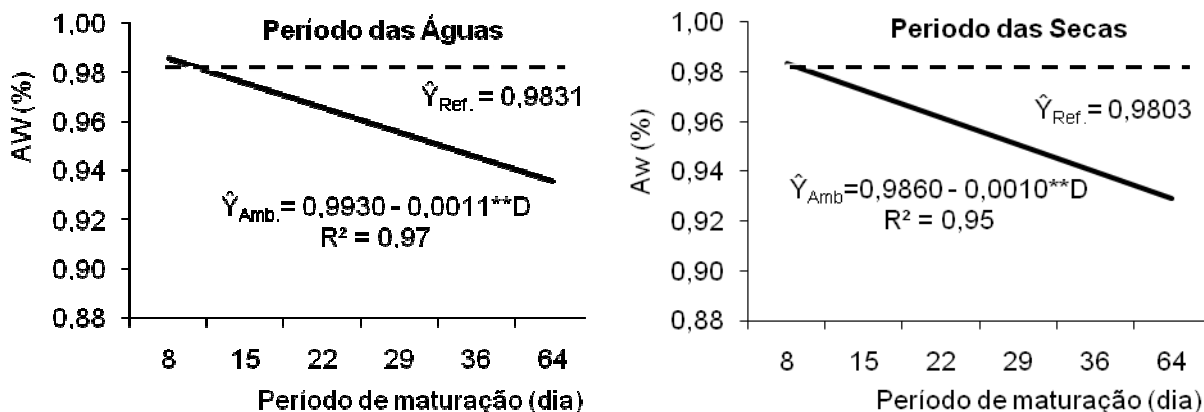
** Significativo pelo teste t (P<0,01).

Figura 15 – Teor de umidade (%) dos queijos Canastra, em função do período de maturação (dias) para as diferentes condições de maturação, durante a coleta das amostras no período das águas e da seca. Amb = maturação na condição ambiente e Ref. = maturação na condição de refrigeração.



** Significativo pelo teste t (P<0,01).

Figura 16 - Teor de cloreto de sódio (% NaCl) dos queijos Canastra, em função do período de maturação (dia) para as diferentes condições de maturação, durante a coleta das amostras no período das águas e da seca. Amb = maturação na condição ambiente e Ref. = maturação na condição de refrigeração.



** Significativo pelo teste t (P<0,01).

Figura 17 – Teor da atividade de água dos queijos Canastra, em função do período de maturação (dias) para as diferentes condições de maturação, durante a coleta das amostras no período das águas e da seca. Amb = maturação na condição ambiente e Ref. = maturação na condição de refrigeração.

A Legislação Federal (BRASIL,1996) classifica os queijos de acordo com teor de umidade no queijo, sendo considerado de alta umidade os queijos que apresentarem umidade entre 46% a 54,9%; média umidade entre 36% e 45,9% e de baixa umidade os queijos que apresentam umidade abaixo de 36%. No entanto a lei estadual N°14185/2002 específica para queijos artesanais e que segue os mesmos padrões da legislação federal, não estabelece teores de umidade, apenas estabelece um limite máximo de 54% de umidade, sendo assim considerado de alta umidade. De acordo com os resultados encontrados neste trabalho, o queijo Canastra pode ser classificado em queijos de alta umidade quando maturados a temperatura de refrigeração, queijos de média umidade quando maturados a temperatura ambiente até 15 dias de maturação e após esses períodos são classificados como de baixa umidade.

Os valores médios de UMD e a Aw dos queijos maturados à temperatura ambiente foram menores do que aqueles sob de refrigeração (Apêndice A). Sendo que os queijos fabricados e maturados no período da seca apresentaram menores médias de UMD e Aw do que aqueles queijos coletados e maturados no período das águas. Esses resultados podem ser justificados pela perda de água do queijo em função das altas temperaturas de maturação, entre 23°C a 27°C e baixa umidade relativa do ar, entre 62% a 68%. Em pesquisas realizadas por NARDES (2002) constatou-se que quando maior a temperatura de maturação, maior será a perda de umidade do queijo e

conseqüentemente a diminuição da A_w e a concentração de sólidos o que aumenta o teor de cloretos.

A UMD e o teor de sal da massa são dois fatores que interferem na A_w dos queijos de forma direta e inversamente proporcional (FURTADO, 1991). Dessa forma, quanto maior o teor de sal presente no queijo, maior será a quantidade de água sorvida, ou seja, a tendência é que o queijo apresente uma menor atividade de água (ECK 1987). E assim, como o teor de sal e a porcentagem de UMD, a A_w não foi afetada ao longo da maturação dos queijos mantidos a temperatura de refrigeração. Os principais fatores que influenciam a diminuição da A_w em queijos é a diminuição do teor de umidade, aumento do teor de sólidos não gordurosos, aumento do teor de NaCl no queijo, diminuição do pH, maturação, quando ocorre o aumento do nitrogênio solúvel e do nitrogênio não protéico e ácidos graxos livres.

4.2.1. Agrupamento das características físico-químicas dos queijos Minas artesanais da região da Serra da Canastra em função do período de fabricação e da temperatura de maturação

A Figura 18 representa os resultados obtidos pelo agrupamento, método hierárquico de ligação simples com base na distância euclidiana dos dados padronizados.

Os resultados demonstram que os queijos maturados nas mesmas condições de temperatura apresentaram características físico-químicas mais próximas, com um pouco mais de similaridade entre aqueles maturados sob temperatura ambiente, aproximadamente 60%.

Mesmo assim, esta similaridade ainda é baixa, o que representa uma falta de padronização do processo produtivo dos queijos artesanais da Canastra, determinado por fatores possivelmente relacionados à composição do leite e ao modo particular de fabricação, como dosagem dos ingredientes (“pingo”, coalho e sal), tempo de coagulação do leite, corte da massa, entre outros.

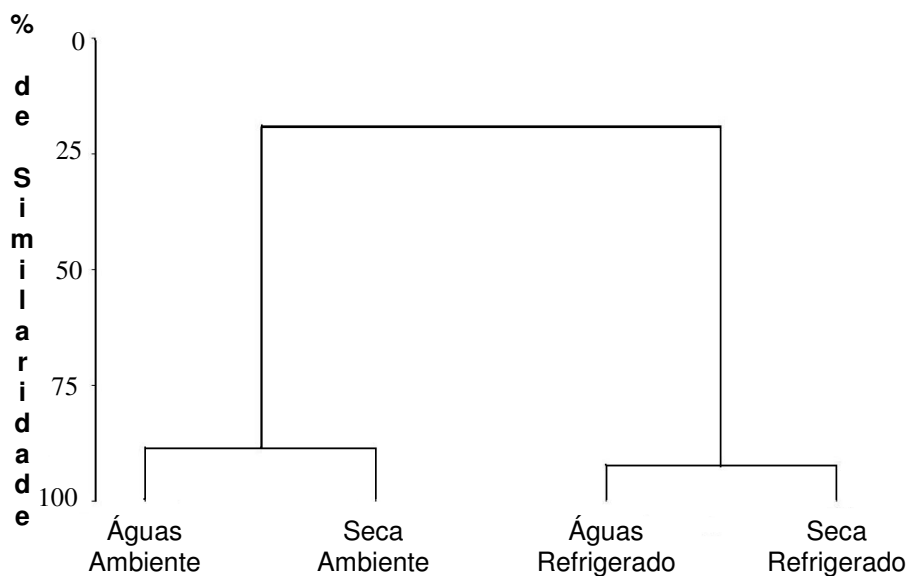


Figura 18 – Dendrograma das características físico-químicas em função do período de fabricação e da temperatura de maturação dos queijos Minas artesanais da Canastra.

A correlação físico-química dos queijos maturados sob refrigeração e à temperatura ambiente apresentou grau de similaridade muito baixo, próximo a 20%, o que indica que o tempo e a condição de maturação a que os queijos foram submetidos provocaram grande diferença na média dos parâmetros analisados (Figura 18). Dessa forma, além da padronização do processo de fabricação, sugere-se que as condições de maturação dos queijos, umidade e temperatura, caso venha a ser implementadas, também sejam controladas, como forma de se atingir padrões de identidade e qualidade constantes e confiáveis, o que favorece a identificação do produto nas gôndolas dos supermercados e a diminuição da sua clandestinidade frente ao comércio paralelo.

4.3. Análises microbiológicas dos Queijos

Os resultados microbiológicos dos queijos Minas artesanais da Canastra devem atender ao disposto na Lei Estadual Nº 14.185 de 31 de janeiro de 2002, que segue os mesmos padrões da Legislação Federal, Portaria Nº146 de 07 de março de 1996 (BRASIL, 1996). Os grupos de microrganismos enfatizados pela legislação federal são, os Coliformes a 30°C e 45°C, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella sp.* e *S. aureus*.

Os valores médios das contagens de mesófilos aeróbios, Coliformes totais, *E. coli*, e *S. aureus*, encontrados no queijo Canastra ao longo do período de maturação (dia) nos dois períodos, águas e seca, maturados a temperatura ambiente e sob refrigeração estão na Tabela 5. Como não se detectou *Listeria sp.* e *Salmonella sp.* nas amostras avaliadas, estes grupos não se encontram presentes nesta tabela. No entanto, é comum a detecção deste grupo microbiano em queijos feitos com leite cru (MORGAN et al., 2001; PAK et al., 2002; VITAS et al., 2003). A ausência destes patógenos no presente estudo supõe a interferência de uma microbiota variada, principalmente de bactérias lácticas, enzimas e substâncias antimicrobianas ao longo do processo de maturação, tornando o ambiente adverso à suas sobrevivências.

Tabela 5 – Média das contagens microbiológicas de mesófilos aeróbios, coliformes totais, *E. coli* e *S. aureus* (Log UFC.g⁻¹) do queijo Canastra, fabricados no período da seca e das águas e maturados à temperatura ambiente e sob refrigeração.

Condição de maturação		Período de maturação (dias)					
		8	15	22	29	36	64
Mesofilos aeróbios							
Águas	Ambiente	8,13a	7,47a	6,73a	6,62a	6,12a	5,62a
	Refrigeração	8,20a	8,05b	7,77b	7,74b	7,99b	7,80b
Secas	Ambiente	7,93A	7,44A	7,36A	7,10A	6,82A	6,56A
	Refrigeração	8,12A	8,02B	8,01B	7,99B	7,92B	7,73
Coliformes Totais							
Águas	Ambiente	3,75a	3,13a	2,15a	1,35a	<1,00a	<1,00
	Refrigeração	4,99b	4,55b	4,29b	3,99b	3,34b	2,78
Secas	Ambiente	3,78A	2,79A	1,89A	1,29A	<1,00A	<1,00
	Refrigeração	3,93A	3,84B	3,37B	2,96B	2,49B	2,09
<i>E. coli</i>							
Águas	Ambiente	3,35a	2,91a	1,73a	1,18a	<1,00a	<1,00
	Refrigeração	4,50b	4,02b	3,81b	3,23b	2,68b	2,09
Secas	Ambiente	3,30A	1,98A	1,46A	1,00A	<1,00A	<1,00
	Refrigeração	3,26A	2,57B	2,15B	1,99B	1,41B	<1,00
<i>S. aureus</i>							
Águas	Ambiente	4,29a	2,75a	1,59a	1,13a	<1,00a	--
	Refrigeração	4,83a	4,35b	3,91b	3,60b	3,59b	2,43
Secas	Ambiente	3,50A	2,70A	1,55A	1,17A	<1,00A	--
	Refrigeração	3,09A	2,78A	2,59B	1,97B	1,78B	1,09

Médias seguidas pela mesma letra minúscula e maiúscula, na coluna, não diferem entre si pelo teste F (P>0,05).

Além disso, nos alimentos, estas bactérias geralmente encontram-se em baixos números e freqüentemente em um estado fisiológico debilitado em função da exposição às condições estressantes advindas do processamento e estocagem a que o alimento é submetido (ALMEIDA e FRANCO, 2003). Ao avaliar queijos artesanais RAPINI et al. (2003); ALMEIDA e FRANCO (2003) e BORELLI (2006) não detectaram a presença, destes microrganismos. MARTINS (2006), ao analisar queijo Minas artesanal da região do Serro, detectou *Salmonella* sp., em uma das 16 amostras analisadas, em queijos maturados por duas semanas. No entanto não detectou *Listeria* sp. nas mesmas amostras.

A redução ou ausência desses grupos contaminantes podem resultar da inibição durante o processo de maturação pela competitividade das bactérias do ácido láctico (BAL) iniciadoras e não iniciadoras do processo fermentativo. O efeito das BAL está associado à produção de ácido láctico, com conseqüente redução do pH, produção de peróxido de hidrogênio, síntese de substâncias antimicrobianas, bacteriocinas, e redução do açúcar disponível e do potencial de oxi-redução (Eh) (CARIDI et al., 2003). Essa redução também pode ainda ser atribuída ao aumento da concentração de cloreto de sódio e diminuição da atividade de água ao longo da maturação, principalmente para os queijos maturados à temperatura ambiente (ERCK, 1987).

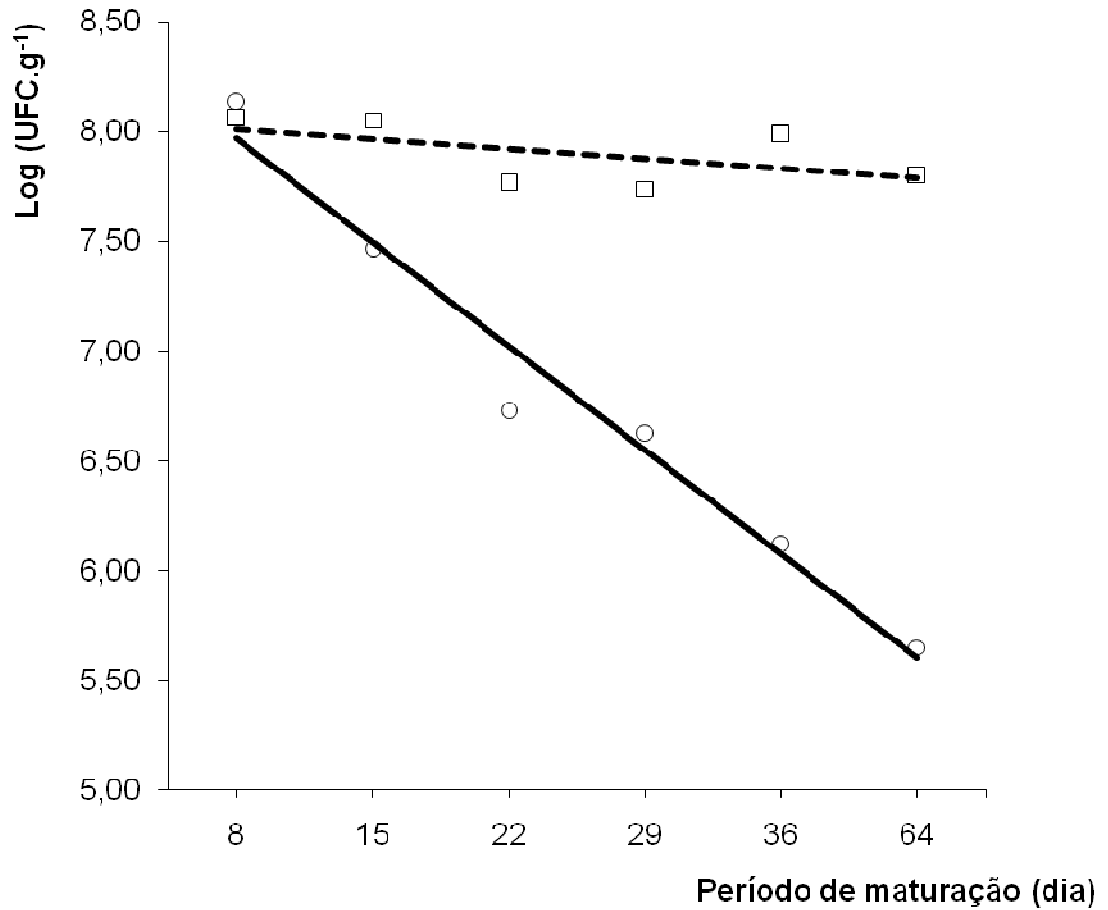
A contagem de mesófilos aeróbios ou contagem total é usada como indicadora da população bacteriana de uma amostra. É uma contagem genérica para microrganismos que crescem aerobicamente em temperaturas de incubação entre 15°C e 45°C, com uma temperatura média de 35°C (CARVALHO, 2001). Independente do período de fabricação, a partir de 15 dias de maturação, as contagens de mesófilos aeróbios maturados à temperatura ambiente apresentaram menores médias ($P < 0,05$) em relação às amostras maturadas sob refrigeração.

A contagem inicial dos queijos no período das águas foi superior ao encontrado no período da seca, onde a temperatura e a umidade relativa do ar, no momento da fabricação e coleta foram superiores (27°C e 68%UR), o que favorece o crescimento de uma microbiota mesófila. Estes resultados mostram, portanto, que a temperatura de maturação e o período de coleta interferem na contagem final desse grupo microbiano. Resultados semelhantes foram encontrados por MARTINS (2006) ao analisar a contagem de mesófilos aeróbios durante o período de maturação, do queijo Minas artesanal da região do Serro onde ao

longo da maturação ocorreu uma redução progressiva do número de mesófilos aeróbios, e essa redução foi bem mais acentuada para os queijos maturados na condição ambiente. Nos queijos fabricados no período das águas e maturados sob refrigeração (Figura 19), não houve diferença significativa ao longo da maturação ($P > 0,01$). Resultados diferentes foram encontrados para os queijos maturados sob refrigeração fabricados no período da seca (Figura 20). De acordo com BERESFORD et al., (2001) a diminuição da contagem bacteriana ao longo da maturação pode estar relacionada com diminuição do Eh, a produção de ácidos orgânicos assim como a perda de água e aumento da concentração de sólidos totais, como NaCl que inibem o crescimento microbiano. Resultados semelhantes ao deste trabalho foram encontrados por ARAÚJO, 2004; PINTO, 2004; BORELLI, 2006; MARTINS, 2006.

A presença de uma microbiota mesófila aeróbica alta tem que ser avaliada a luz da matriz alimentar. Quando se trata de queijo esse grupo microbiano pode estar relacionado a uma alta concentração de bactéria láctica.

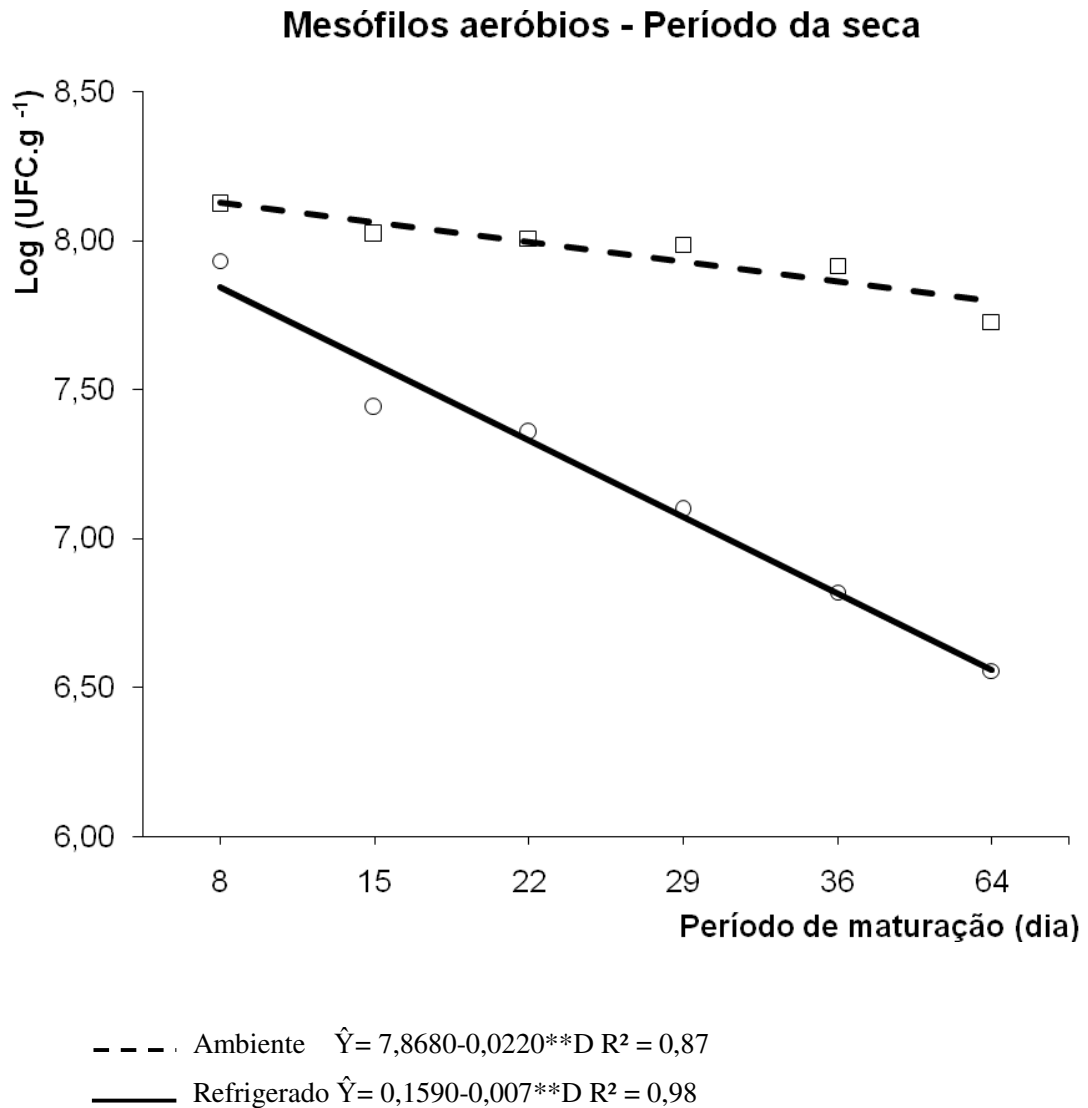
Mesófilos aeróbios - Período das águas



--- Refrigerado $\hat{Y} = 8,060 D$
— Ambiente $\hat{Y} = 8,631 - 0,075^{**}D R^2 = 0,93$

**Significativo pelo teste t (P<0,01).

Figura 19 – Estimativa das contagens de mesófilos aeróbios do queijo Canastra em função dos períodos de maturação (dia) para as diferentes condições de maturação, durante a coleta das amostras no período das águas.



**Significativo pelo teste t (P<0,01)

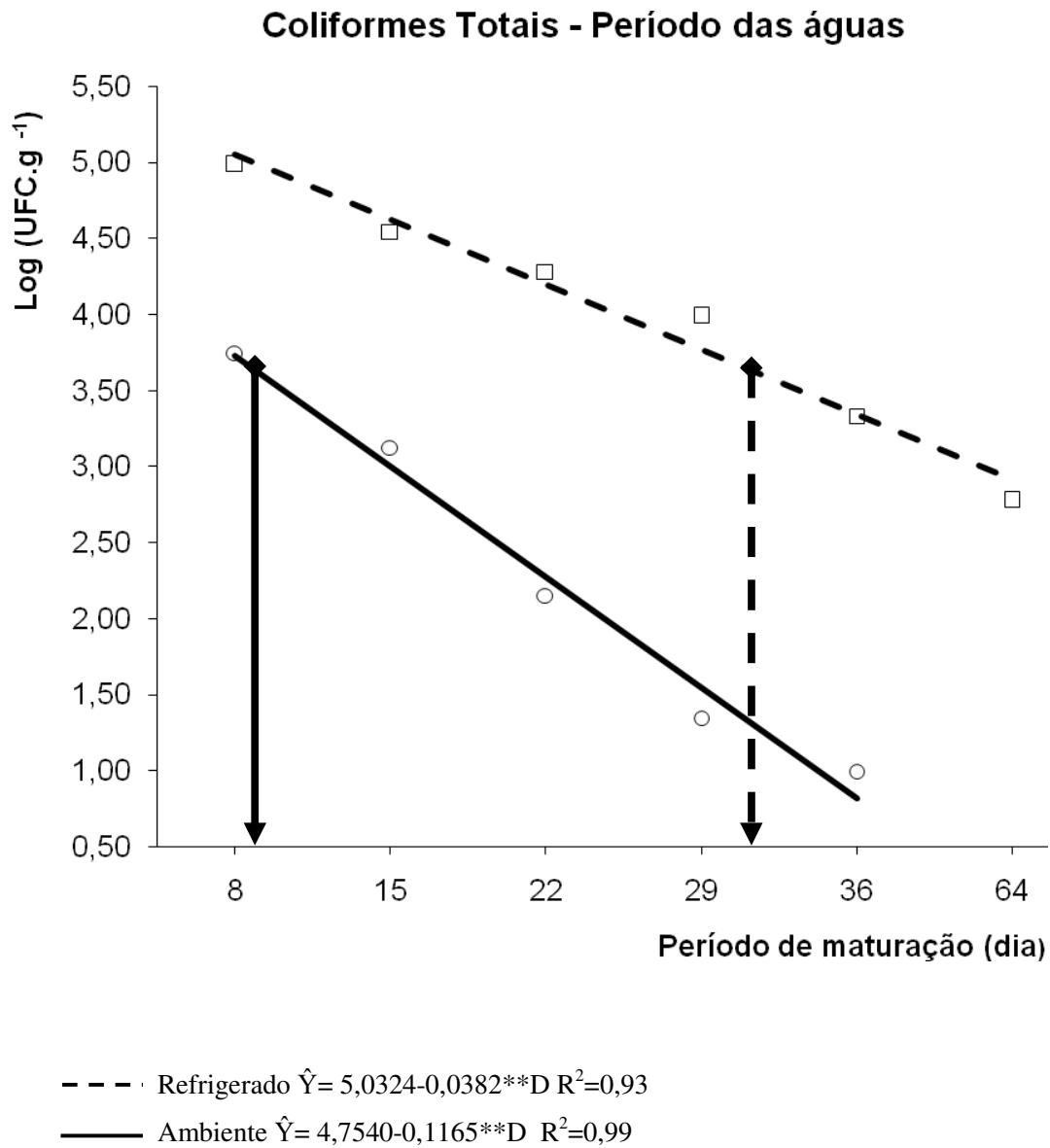
Figura 20 – Estimativa da Contagem de mesófilos aeróbios do queijo Canastra em função dos períodos de maturação (dia) para as diferentes condições de maturação, durante a coleta das amostras no período da seca.

A maturação dos queijos foi decisiva no sentido de reduzir a população microbiana do grupo de contaminantes, coliformes totais, *E. coli* e *S. aureus*. A partir de 15 dias, tanto no período das águas como no período da seca, as médias das contagens dos grupos de contaminantes, foi menor ($P > 0,05$) nas amostras maturadas a temperatura ambiente, do que naquelas maturadas sob refrigeração (Tabela 5).

Para os queijos fabricados e acondicionados no período das águas, as médias das contagens da microbiota contaminante foram maiores do que aquelas do período da seca ao longo do período da maturação indicando que as condições higiênico-sanitárias, temperatura e umidade favorecem o crescimento bacteriano (Tabela 05). De maneira geral, estes resultados assemelham-se àqueles encontrados por SOUZA et al. (2003), IURLINA et al. (2004) e MARTINS (2006) para queijos artesanais.

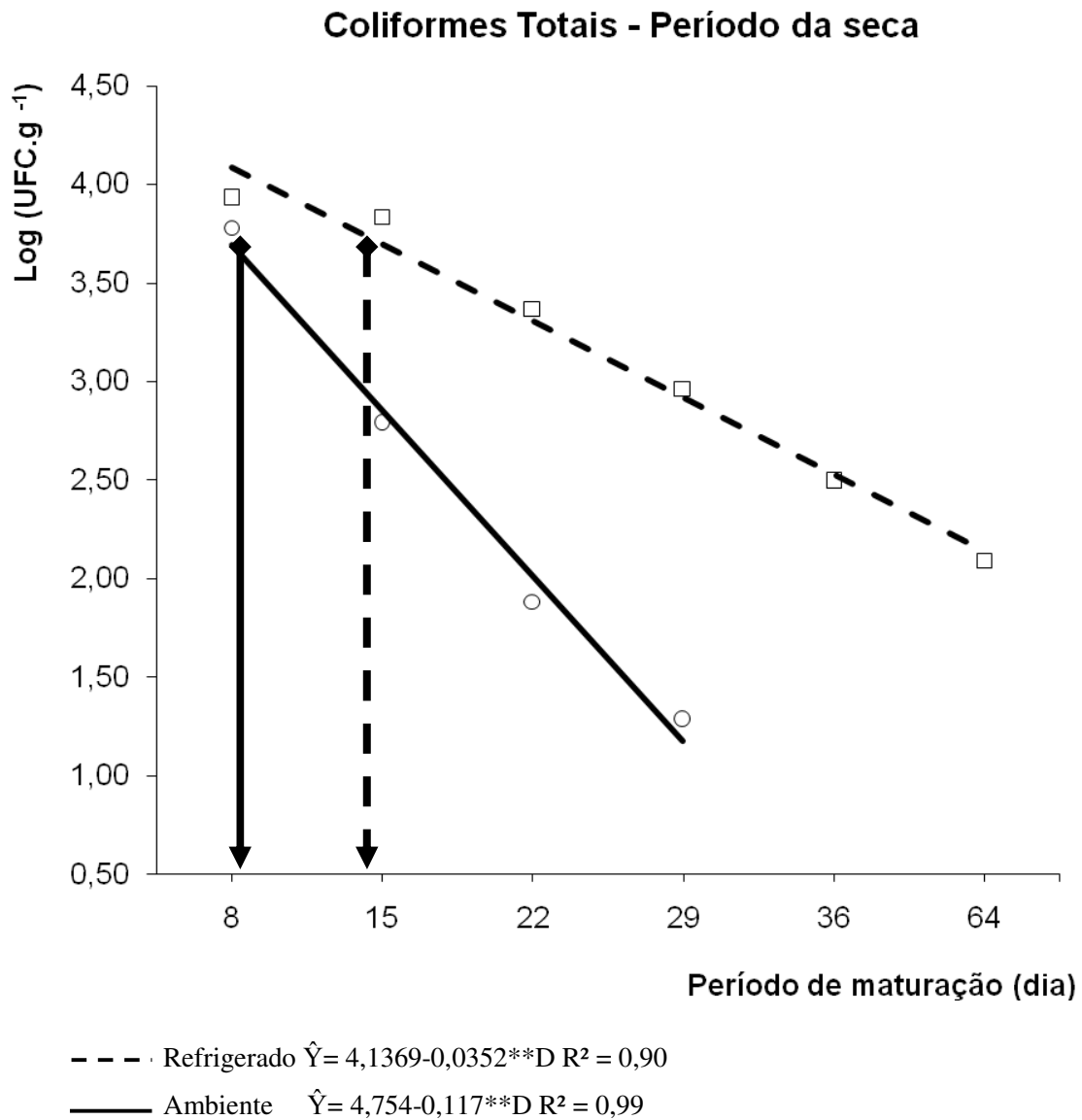
Todas as amostras de queijos Canastra, com oito dias de maturação, apresentaram as contagens de coliformes totais, *E. coli* e *S. aureus*, superiores ao permitido pela legislação. Este resultado pode ser explicado pela alta contaminação da matéria-prima desses queijos, que não recebe nenhum tipo de tratamento térmico. Outras fontes de contaminação que também podem ser citadas são a baixa qualidade da água usada na fabricação e práticas inadequadas de fabricação por parte dos manipuladores. MARTINS (2006) ao analisar a qualidade microbiológica do leite, da água e do “pingo” utilizado na fabricação do queijo Minas artesanal da região do Serro encontrou contagens superiores a 10^4 UFC g⁻¹ de coliformes Totais e *E. coli*. Resultados similares foram encontrados por BORELLI et al. (2006), para leite cru, água e “pingo” utilizados na fabricação desse mesmo queijo.

O período de maturação causou um efeito linear negativo para as contagens de coliformes totais (Figura 21 e 22), *E. coli* (Figura 23 e 24) e *S. aureus* (Figura 25 e 26). Apesar das altas contagens iniciais, ao longo da maturação ocorreu uma redução progressiva ($P < 0,01$), numa velocidade ainda maior para os queijos maturados a temperatura ambiente. Considerando que esses queijos são produzidos com leite cru, o metabolismo das bactérias lácticas maturadoras, acarreta em acúmulo de substâncias que antagonizam patógenos, este metabolismo é acelerado numa temperatura mais alta. Deste modo, nos queijos maturados a temperatura ambiente as contagens dos microrganismos avaliados foram reduzidas mais rapidamente.



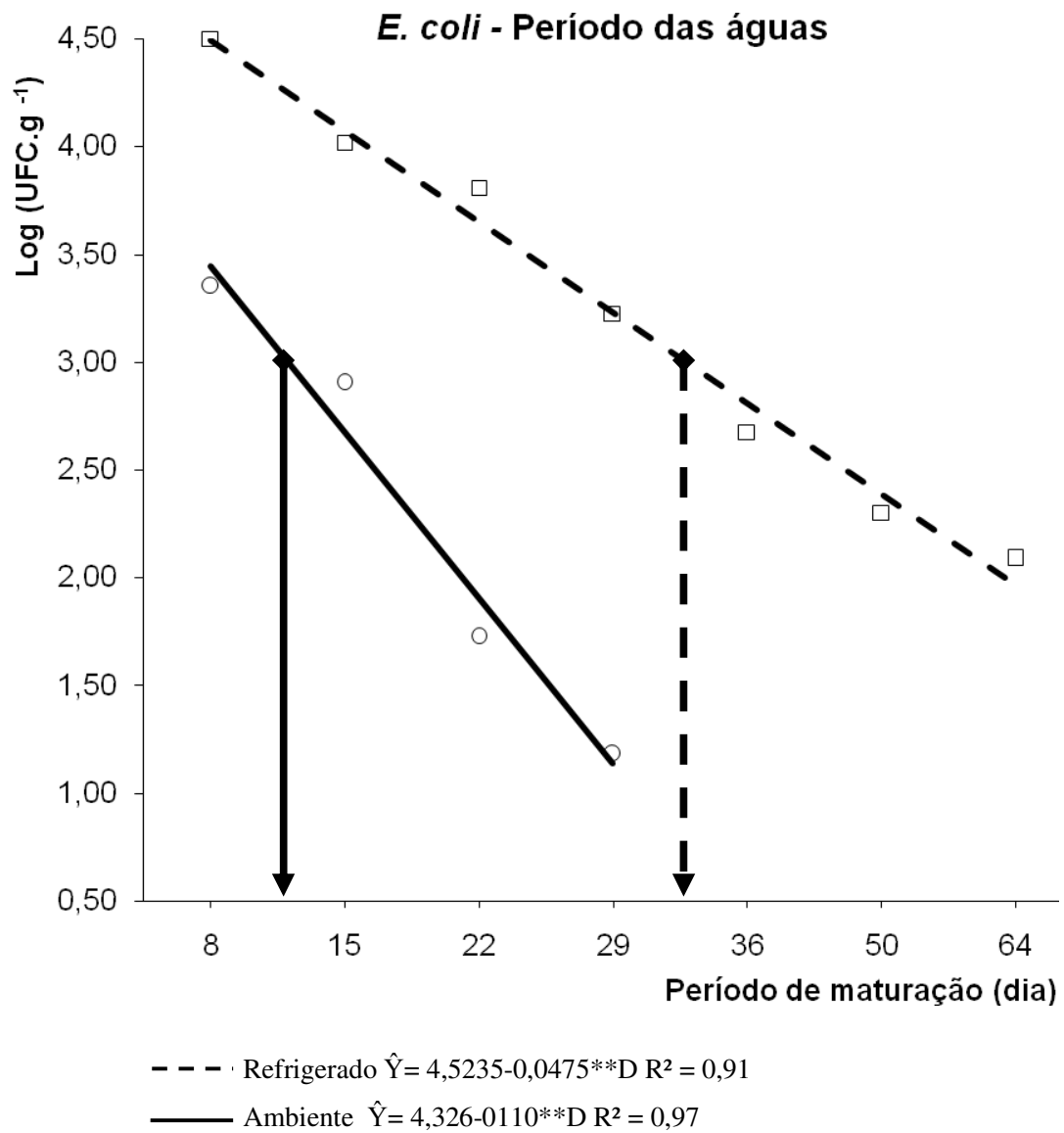
**Significativo pelo teste t (P<0,01).

Figura 21 – Estimativa da contagem máxima tolerada de Coliformes totais do queijo Canastra em função dos períodos de maturação (dia) para as diferentes condições de maturação, durante a coleta das amostras no período das águas.



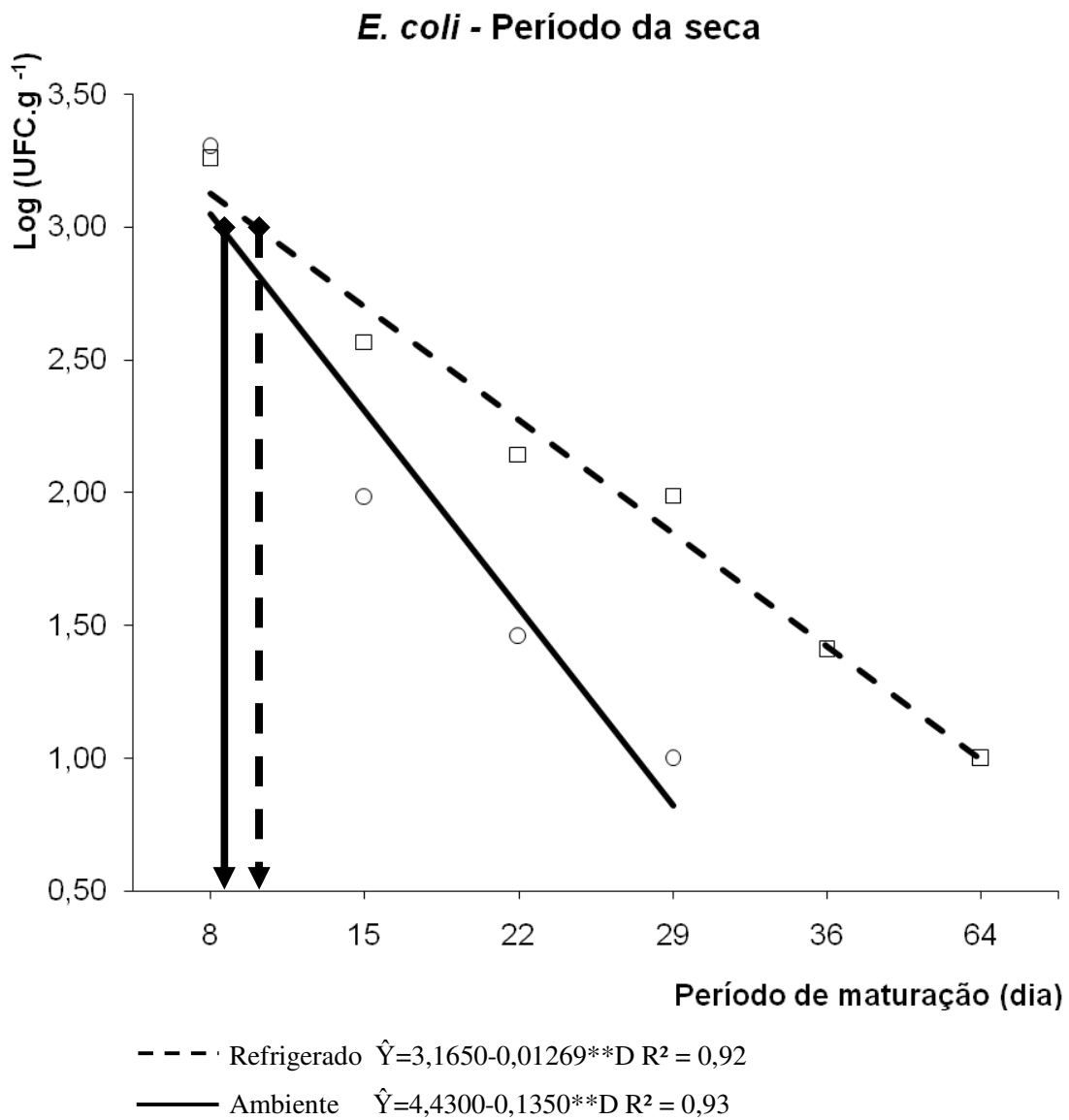
**Significativo pelo teste t (P<0,01).

Figura 22 – Estimativa da contagem máxima tolerada de Coliformes totais do queijo Canastra em função dos períodos de maturação (dias) para as diferentes condições de maturação, durante a coleta das amostras no período da seca.



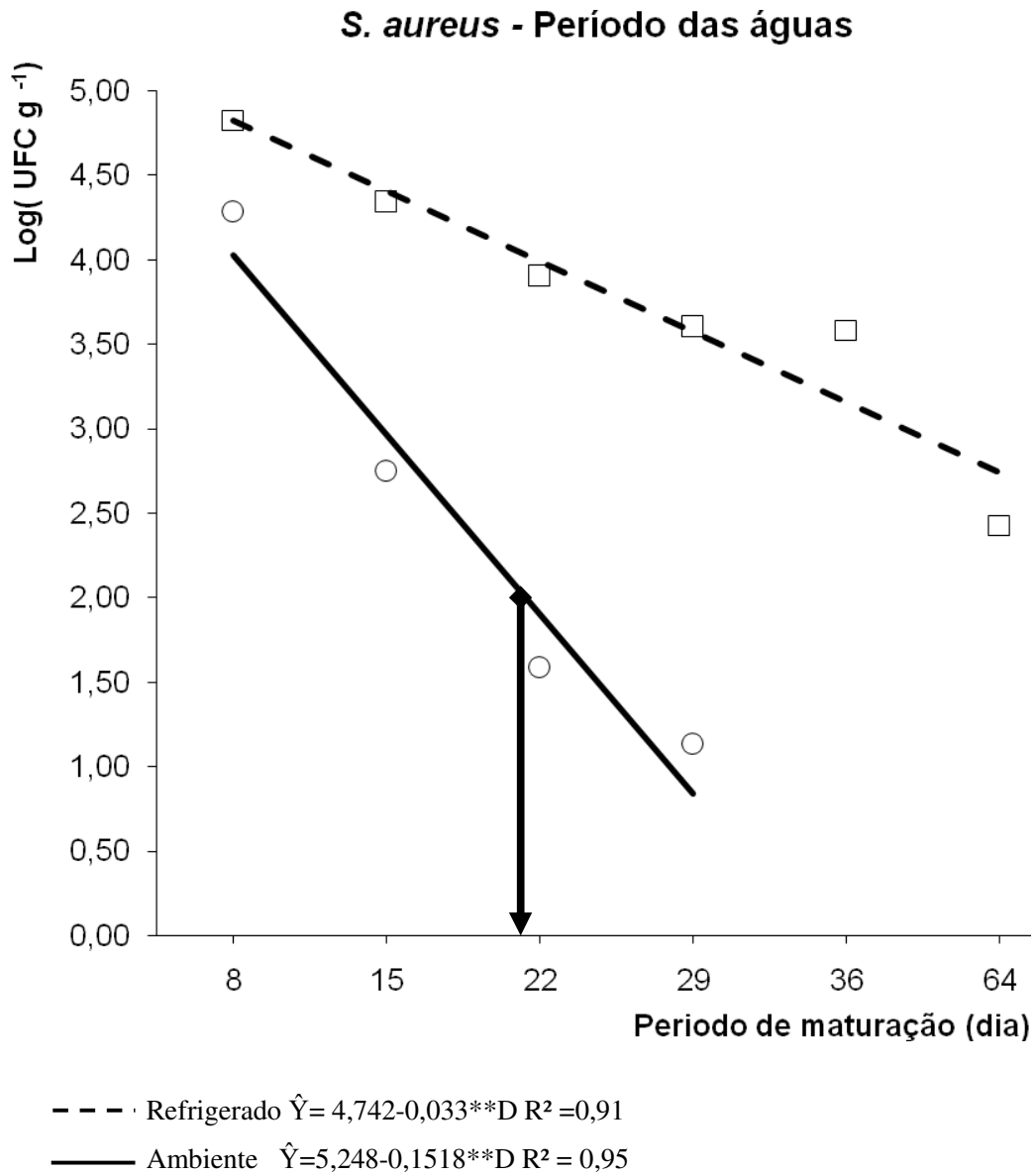
**Significativo pelo teste t (P<0,01).

Figura 23 – Estimativa da contagem máxima tolerada de *Escherichia coli* queijo Canastra em função dos períodos de maturação (dias) para as diferentes condições de maturação, durante a coleta das amostras no período das águas.



**Significativo pelo teste t (P<0,01).

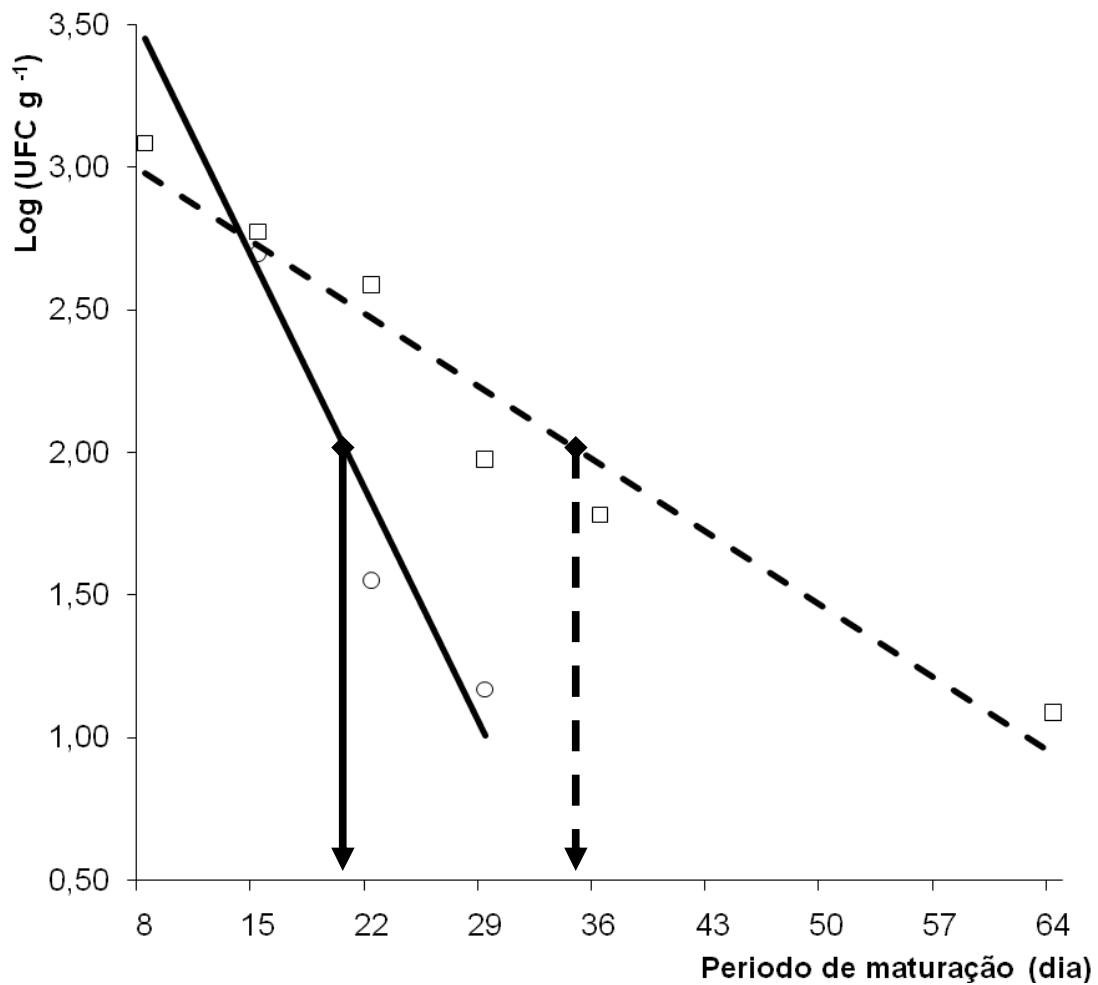
Figura 24 – Estimativa da contagem máxima tolerada de *Escherichia coli* queijo Canastra em função dos períodos de maturação (dias) para as diferentes condições de maturação, durante a coleta das amostras no período da seca.



**Significativo pelo teste t (P<0,01).

Figura 25 – Estimativa da contagem máxima tolerada de *S. aureus* nos queijos Canastra em função dos períodos de maturação (dia) para as diferentes condições de maturação, durante a coleta das amostras no período das águas.

S. aureus - Período da seca



--- Refrigerado $\hat{Y} = 3,2702 - 0,0363 \cdot D$ $R^2 = 0,95$

— Ambiente $\hat{Y} = 4,3820 - 0,1160 \cdot D$ $R^2 = 0,97$

**Significativo pelo teste t ($P < 0,01$).

Figura 26 – Estimativa da contagem máxima tolerada de *S. aureus* nos queijo Canastra em função dos períodos de maturação (dia) para as diferentes condições de maturação, durante a coleta das amostras no período da seca.

Na Tabela 6 estão indicadas as variáveis microbiológicas para queijos artesanais conforme o disposto a Lei estadual Nº 14.185/2002 e na Tabela 7 apresenta o período em dias em que os produtos coletados nos dois períodos e maturados nas duas condições estariam disponíveis para o consumo levando-se em consideração a adequação o grau de *S. aureus* que foi a espécie que permaneceu por mais tempo nas condições indicadas.

Tabela 6 - Padrões microbiológicos estabelecidos pela legislação federal (BRASIL, 1996) e estadual de acordo com teor de umidade dos queijos

Microrganismos (UFCg ⁻¹)	Lei Estadual Nº 14.185		Legislação Federal	
	Alta umidade (46% a 55%)	Alta umidade (46% a 55%)	Média umidade (36% a 46%)	Baixa umidade (>36%)
Coliformes 30° C	5x10 ³	5x10 ³	1x10 ³	2x10 ²
Coliformes 45° C	1x10 ³	1x10 ³	1x10 ²	1x10 ²
<i>S. aureus</i>	1x10 ²	1x10 ²	1x10 ²	1x10 ²
<i>L. monocytogenes</i>	Ausência*	Ausência*	Ausência*	Ausência*
<i>Salmonella</i> sp	Ausência*	Ausência*	Ausência*	Ausência*

*Ausência em 25g de queijo.

Tabela 7 – Estimativa do período mínimo de maturação dos queijos Canastra para adequação das exigências microbiológicas estabelecidas pelas legislações estaduais e federais.

Contagens	PF	TM	Legislação Estadual (Lei nº14.185/2002)	Legislação Federal (BRASIL 1996)
Coliformes Totais	Águas	Ambiente	10 dias	16 dias
		Refrigerado	35 dias	35 dias
	Seca	Ambiente	10 dias	21 dias
		Refrigerado	13 dias	13 dias
<i>E. coli</i>	Águas	Ambiente	13 dias	22 dias
		Refrigerado	32 dias	32 dias
	Seca	Ambiente	11 dias	18 dias
		Refrigerado	13 dias	13 dias
<i>S. aureus</i>	Águas	Ambiente	22 dias	22 dias
		Refrigerado	84 dias	84 dias
	Seca	Ambiente	21 dias	21 dias
		Refrigerado	35 dias	35 dias

PF: Período de fabricação; TM: temperatura de maturação

De acordo com os dados foram necessários 22 dias de maturação ambiente para que o queijo Canastra seja considerado adequado para o consumo. Já o produto maturado sob refrigeração, no período da seca precisou de 35 dias e as amostras coletadas no período das águas, valor estimado de 84 dias para atingir a mesma adequação ($< 2,0 \text{ Log ufc g}^{-1}$). Aos 64 dias a média encontrada desses queijos foi de $2,43 \text{ Log ufc g}^{-1}$ (Tabela 5). Considerando-se que este período é superior ao indicado para maturação de queijos feitos com leite cru, é preocupante a indicação da maturação sob refrigeração, para tais queijos.

Cumprir lembrar que a legislação federal, para queijos de modo geral, estabelece três graus que são baseados no teor de umidade dos queijos. O queijo mantido sob refrigeração, não perdeu água durante a maturação e assim, com 64 dias foi considerado queijo de alta umidade. Desta forma os níveis microbiológicos exigidos são menores para os queijos de baixa umidade, do que aqueles de alta umidade no qual a legislação é menos rigorosa. O queijo mantido a temperatura ambiente enquadra-se em queijo de média e baixa

umidade o que levaria a necessidade de uma realvaliação dos padrões atuais indicados pela lei estadual.

Considerando-se 21 dias para o queijo do período da seca e 22 dias para o queijo do período das águas, pode-se deduzir não haver diferença significativa no tempo de adequação do produto maturado a temperatura ambiente nos dois períodos. O queijo coletado no período da seca independe da temperatura de maturação poderia ser consumido com 36 dias. No entanto, no período das águas levaria a um valor estimado de 84 dias para o enquadramento à legislação, o que o tornaria inviável sua comercialização, em função da total descaracterização sensorial do mesmo. Assim a temperatura de refrigeração, não foi suficiente para manter a qualidade microbiológica desses queijos e ao mesmo tempo dificultou a redução microbiana ao longo da maturação.

4.3.1. Análise de enterotoxina estafilocócica

Apesar da detecção de enterotoxina pelo teste “Vidas” ser mais sensível que o método tradicional OSP, a presença de enterotoxina não foi detectado em nenhuma das amostras. No entanto este resultado foi controverso, uma vez que, na literatura, foi detectada a presença de enterotoxina para queijos artesanais da mesma região (ORNELLAS, 2005 e BORELLI, 2006) a partir da metodologia tradicional. As razões pelas quais não foi detectado a presença de enterotoxina pelo método “Vidas” ainda não se sabe, mas acredita-se que, o queijo artesanal por ser produzido com leite cru, a fosfatase endógena presente neste, pode interferir na leitura dos resultados.

Pelo método OSP, para os quatro tipos de enterotoxina testados (SEA, SEB, SEC e SED), apenas a SEA foi encontrada (Tabela 12).

Tabela 12 – Contagem de *S. aureus* e presença de enterotoxina do queijo Canastra nas amostras analisadas.

Período	Produtor	<i>S. aureus</i> (ufc g ⁻¹)	SEA	SEB	SEC	SED
Águas	01	5,18	Neg	Neg	Neg	Neg
	02	5,26	Pos	Neg	Neg	Neg
	03	3,48	Pos	Neg	Neg	Neg
	04	3,56	Pos	Neg	Neg	Neg
	05	3,70	Neg	Neg	Neg	Neg
	06	5,88	Pos	Neg	Neg	Neg
	07	3,48	Pos	Neg	Neg	Neg
	08	3,78	Pos	Neg	Neg	Neg
Seca	01	3,18	Pos	Neg	Neg	Neg
	02	3,11	Pos	Neg	Neg	Neg
	03	3,30	Pos	Neg	Neg	Neg
	04	4,60	Pos	Neg	Neg	Neg
	05	3,15	Neg	Neg	Neg	Neg
	06	3,45	Neg	Neg	Neg	Neg
	07	3,53	Pos	Neg	Neg	Neg
	08	3,72	Pos	Neg	Neg	Neg

Pos.: Presença de enterotoxina; Neg.: Ausência de enterotoxina

A enterotoxina do tipo SEA é a mais comumente envolvida em intoxicação estafilocócica em alimento. Estudos indicam que 100ng a 200ng de SEA podem produzir sintomas de intoxicação. Das 16 amostras de queijos analisadas no período das águas e 16 analisadas no período da seca, 75% das amostras apresentaram a enterotoxina do tipo SEA, em cada período, não havendo influência do período de fabricação em relação à produção de enterotoxina (Tabela 12). BORELLI et al. (2006) ao analisar a presença de enterotoxina estafilocócica em queijos artesanais encontrou a SEB e SEC enquanto que GÓMEZ-LÚCIA et al. (1992), ao estudar a produção de enterotoxina, também em queijos artesanais, encontrou as enterotoxinas do tipo SEA e SED. Segundo BERGDOLL (1995), a não detecção de enterotoxinas pode ser explicada em parte pela menor sensibilidade do método OSP, comparado a outras técnicas.

Sugere-se a partir deste estudo experimentação a necessidade de se acompanhar a enterotoxina durante a maturação. Somente desta forma ter-se-á uma indicação da

maturação num prazo exequível como meio de adequação do queijo artesanal da Canastra feito com leite cru.

4.3.2. Agrupamento das características microbiológicas do queijo artesanal da Canastra em função do período de fabricação e da temperatura de maturação.

Na Figura 27 estão representados os resultados obtidos pelo agrupamento (método hierárquico de ligação simples baseado na distância euclidiana dos dados padronizados) das combinações dos dois períodos de fabricação (águas/seca) e em duas temperaturas de maturação (ambiente e refrigerado).

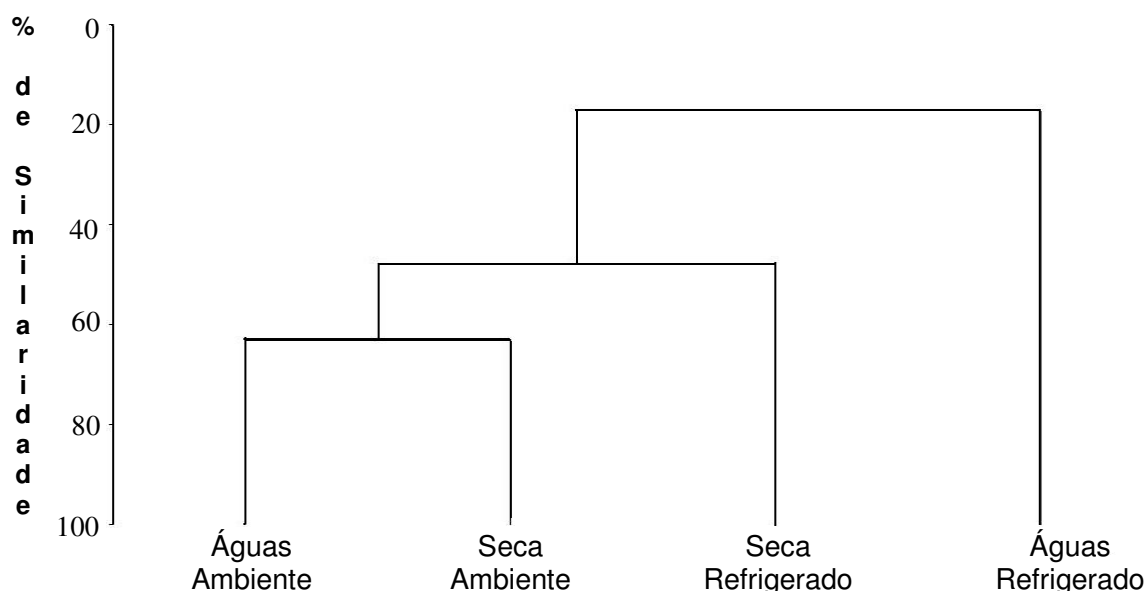


Figura 27 – Dendrograma das características microbiológicas em função do período de fabricação e da temperatura de maturação do queijo artesanal da Canastra.

De acordo com os resultados obtidos os queijos maturados a temperatura ambiente apresentaram uma similaridade de aproximadamente 60%, o que indicou que independente do período de fabricação, os queijos maturados nessa condição apresentaram menores médias microbiológicas ao longo da maturação e mantiveram o mesmo percentual de similaridade. No entanto essa porcentagem ainda é baixa, porém os queijos mantidos sob

refrigeração apresentaram uma similaridade ainda menor (< 20%). A baixa similaridade apresentada entre eles indicou que a refrigeração contribuiu para a manutenção, por períodos mais prolongados, das contagens microbianas médias, principalmente no período das águas.

No entanto, o mesmo não foi observado para os queijos maturados sob refrigeração. A baixa similaridade (< 40%) apresentada entre eles indica que a refrigeração contribuiu para a manutenção, por períodos mais prolongados, das contagens microbianas médias, principalmente no período das águas.

Já os queijos fabricados no período da seca apresentaram similaridade acima de 40%, enquanto que os queijos fabricados no período das águas tiveram similaridade próxima a 20%. Essa diferença entre os períodos de fabricação demonstrou que as contagens microbiológicas tendem a ser menores no período da seca, confirmando os resultados encontrados nos testes de média (Figura 27).

Dessa forma, medidas higiênico-sanitárias mais drásticas no período das águas deverão ser adotadas principalmente nas fases de obtenção do leite e manipulação dos queijos, como forma de diminuir a contagem microbiana inicial dos mesmos, melhorando a sua qualidade e resguardando a saúde do consumidor.

5. CONCLUSÃO

O armazenamento do queijo artesanal da Canastra, a temperatura ambiente resultou na aceleração ($P < 0,01$) do processo de maturação em todas as características físico-químicas avaliadas, ao passo que os queijos mantidos sob refrigeração não apresentaram efeito da maturação ($P > 0,01$) apenas para os valores médios de gordura no extrato seco, nitrogênio solúvel em pH 4,6 e nitrogênio solúvel em TCA 12%.

Em geral, de acordo com a legislação federal, todos os queijos foram classificados como gordos por possuírem valores médios de gordura no extrato seco entre 45% e 59,9%. E ainda classificados como queijos de alta umidade quando maturados a temperatura de refrigeração, teor de umidade entre 46% e 54,9%, queijos de média umidade com até 15 dias de maturação a temperatura ambiente e queijo de baixa umidade com mais de 15 dias a mesma temperatura.

O agrupamento das características físico-químicas demonstrou uma baixa similaridade entre os queijos artesanais, o que indica a necessidade da implementação de sistemas que auxiliem a padronização do processo de fabricação.

A influência do período de maturação nas características físico-químicas dos queijos maturados a temperatura ambiente teve um efeito significativo na modulação da microbiota presente, com redução nas contagens de mesófilos aeróbios, coliformes totais, *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*. Os gêneros *Listeria* sp. e *Salmonella* sp. não foram detectadas em nenhuma das amostras de queijos analisadas. A espécie *Staphylococcus aureus* permaneceu por mais tempo em contagens acima do limite legal definindo o tempo mínimo necessário para a maturação de tais queijos. Assim, independente do período de coleta a temperatura ambiente foi decisiva para redução da microbiota patogênica com 22

dias de maturação. Por sua vez, os queijos maturados sob refrigeração só atingiram os níveis permitidos pela legislação aos 37 dias, para queijos fabricados no período da seca, e, ao valor estimado de 87 dias para aqueles fabricados no período das águas.

Os resultados encontrados neste trabalho indicam que a maturação sob temperatura de refrigeração não foi suficiente para reduzir a microbiota patogênica a níveis inferiores ao limite legal, gerando queijos com 64 dias de maturação com baixa qualidade microbiológica e descaracterizado sensorialmente. A indicação da refrigeração para a maturação do queijo Minas artesanal deve ser revista pelos órgãos competentes, uma vez que, esse tipo de tratamento não garante a segurança do produto.

Os queijos Minas artesanais precisam ser caracterizados dentro de cada uma das regiões produtoras do estado para que medidas como a determinação de do tempo mínimo de maturação sejam tomadas sem se esquecer de se conhecer o efeito da maturação na modulação da enterotoxina estafilocócica, importante para segurança alimentar desses queijos.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

A. O. A. C. Extraneous Materials: Isolation. In: _____. Official Methods of Analysis, 14th ed., Washington, D.C., 1984. p.887–935.

ABIQ. Associação Brasileira das Indústrias de Queijo. Consumo de queijos em diversos países. Informação pessoal: abiq@abiq.com.br. 23/09/2004.

ALMEIDA, P. M. P. e FRANCO, R. M. Avaliação bacteriológica de queijo tipo Minas frescal com pesquisa de patogenos importantes a saúde publica: *Staphylococcus aureus*, *Salmonella sp.* e coliformes fecais. **Higiene Alimentar**, v. 17, p.79-85, 2003.

AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION - APHA. Compendium for methods for microbiological examination of foods. Washington. D.C.: 2001. 1219p.

ARAÚJO, R. A. B. M. **Diagnóstico socioeconômico, cultural e avaliação dos parâmetros físico-químicos e microbiológicos do queijo Minas artesanal da região de Araxá.** 2004. 148 p. (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa. 2004.

ASSIS, E. M. DE. **Comportamento de *Staphylococcus aureus* e formação de injúria durante o período de comercialização dos queijos Minas e Mussarela.** 1990. 95 p. (Mestrado em Ciência dos Alimentos) – Escola Superior de Agricultura de Lavras, Lavras. 1990.

AYGUN, O., ASLATAS, O., ONER, S. A survey on the microbiological quality of Carra, a traditional Turkinh cheese. **Jounal of food Engineering**, v.66, p.401- 404, 2005.

BALABANA N.; RASOOLY A. Staphylococcal Enterotoxins. **International Journal of Food Microbiology**, v. 61, p. 1-10, 2000.

BERESFORD, T. P.; FITZSIMONS, N. A.; BRENNAN, N. L.; COGAN, T. M. Recent advances in cheese microbiology. **International Dairy Journal**, v.11, p. 259-274, 2001.

BERGEDOLL, M. S. Analytical Methods for *Staphylococcus aureus*. **International Journal of Food Microbiology**, v. 10, p. 91-100, 1990.

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

BORSARI, P. L. A importância da análise microscópica e histológica em leites e derivados. **Revista Aditivos e Ingredientes**, v. 16, 2001.

BRASIL. Diário Oficial da União – D.O.U. Portaria nº 146, de 7 de março de 1996. Aprova os regulamentos técnicos de identidade e qualidade dos produtos lácteos. Brasília, 3977-3986, 11 de março de 1996. Seção 1.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Departamento de Inspeção de Produtos de Origem Animal. Resolução nº 07, de 28 de novembro de 2000. Anexo I: Critérios de Funcionamento e de Controle da Produção de Queijarias, para Seu Relacionamento Junto ao Serviço de Inspeção Federal. Brasília, 2000.

BRITO, J. R. F.; DIAS, J. C. A qualidade do leite. Juiz de Fora: EMBRAPA / São Paulo: TORTUGA. 88p. 1998

CARDOSO, F.H.T. **Identificação de fatores de virulência e susceptibilidade a antimicrobianos de *Staphylococcus aureus* isolados de amostras de leite bovino em Minas Gerais.** 1999. 88 p. (Mestrado em Medicina Veterinária Preventiva) - Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte. 1999.

CARIDI, A.; MICARI, P.; FOTI, F.; RAMONDINO, D.; SARULLO, V. Ripening and seasonal changes in microbiological and chemical parameters of the artisanal cheese Caprino d'Aspromonte producer from raw or thermized goat's milk. **Food Microbiology**, v. 20, p. 201 – 209, 2003.

CARMO, L. S. do.; DIAS, R. S.; LINARDI, V. R.; SENA, M. J. de.; SANTOS, D. A. dos.; FARIA, M. E. de.; PENA, E. C.; JETT, M.; HENEINE, L.G. Food poisoning due to enterotoxigenic strains of Staphylococcus present in Minas cheese and raw milk Brazil. **Food Microbiology**, v. 19, p. 9-14, 2002.

CARVALHO, E. P. de. Microbiologia de Alimentos, saúde pública e legislação. Lavras: UFLA/FAEPE. p.171. 2001.

CARVALHO, F.A; SILVA, P. H. F. Alternativa para a aceleração da maturação de queijos. **Leite e Derivados**. v. 11, p. 36-38, 1993

CHESNEY, P.J. Clinical aspects and spectrum of illness of toxic shock syndrome: overview. **Rev.Inf. Dis.**, v.11, p.51-57, 1989.

CHOISY, C.; DESMAZEAUD, M.J.; GRIPON, J.C.; LAMBERET, G.; LENOIR, J.; TOURNEUR, C. Os fenômenos microbiológicos e enzimáticos e a bioquímica da cura (Afinação). In: ECK, A. **O queijo**. 1.ed., v.1, p. 337, 1987.

COGAN T.M.; HILL, C. Cheese *Starter Cultures*. In: FOX, P.F. **Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology**. v.1, 2.ed. Chapman and Hall, London, United kingdom, p. 599, 1993.

CORDANO, A. M.; ROCOURT, J. Occurrence of *Listeria monocytogenes* in food in Chile. **International Journal of Food Microbiology**. v. 70, p. 175 – 178, 2001.

CORREIA, M.; RONCADA, M. J. Características microscópicas de queijo Prato, Mussarela e Mineiro comercializados em feiras livres da cidade de São Paulo. **Revista Súde Pública**, v. 31, p. 296-301, 1997.

CRASS, B. A.; BERGDOLL, M. S. Involvement of coagulase-negative staphylococci in toxic shock syndrome. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 23, p. 43-45, 1986.

CREAMER, L. K. e OLSON, N. F. Rheological evaluation of maturing cheddar cheese. **Journal of Food Science**, v. 47, p. 631-646, 1982.

DAHL, S.; TAVARIA, F. K.; MALCATA, F. X. Relationships between flavour and microbiological profiles in Serra da Estrela cheese throughout ripening. **International Dairy Journal**, v. 10, p.255-262, 2000.

DE BUYSER, M. L; DUFOUR, B.; MAIRE, M.; LAFARGE, V. Implication of milk and milk products in food-borne diseases in France and different industrialized countries. **International Journal Food Microbiology**, v.67, Issues 1-2, p. 1-17, 2001.

DINGES, M.M.; ORWIN, P.M.; SCHLIEVERT, M.P. Exotoxins os produtos elaborados por *Staphylococcus aureus*. **Rev. Clin. Microbiol.**, v.13, p.16-34, 2000.

EARLY, R. The technology of dairy products. 2ª ed. Edição: Ralph EARLY. Londres. 1998.

ECK, A. O Queijo, 1º Volume, coleção EUROAGRO, Publicações Europa – América. p. 336, 1987.

EMATER. Ações Extensionistas para o Desenvolvimento Rural Sustentável. Revista da EMATER – MG. Ano XXII – Nº 77. Julho de 2003. p. 16 – 17.

EMATER. Queijo Minas Artesanal: Tradição e Qualidade que Revelam Minas. Revista da EMATER – MG. Ano XXII – Nº 80. Agosto de 2004. p. 8 – 9.

ESTEBAN, M.A.; MARCOS, A. Equations for calculation of water activity in cheese from its chemical composition: a review. **Food Chemistry**, v.35, p.179-186, 1990

FARKIE, N.Y e FOX, P.F. Objective índices of cheese ripening. **Trends in Food Science e Technology**, Ago. p.37- 40, 1990.

FEITOSA, T.; BORGES, M. F.; NASSU, R.; AZEVEDO, E. H. F.; MUNIZ, C. R. Pesquisa de *Salmonella sp.*, *Listeria sp.* e microrganismos indicadores higiênico-sanitários em queijos produzidos no estado do Rio Grande do Norte. **Revista Ciência e Tecnologia de Alimentos**. Campinas, v. 23, p. 162-165. 2003.

FERREIRA, C. L. L. F. Lipídeos e a ação lipolítica em produtos lácteos fermentados. **Indústria de Laticínios**. v. 33, p. 56-58, 2001.

FERREIRA, C. L. L. F. Queijo: Mineiros tentam ajustar modernidade e produção artesanal. **Revista Globo Rural**, Ano 17, v. 200, p. 41, 2002.

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

FOX, P. F.; GUINEE, T. P.; COGAN, T. M. e McSWEENEY, P. L. H. **Fundamentals of Cheese Science**. Gaithersburg Maryland: Aspen Publishers. 2000. 587p

FOX, P. F.; LAW, J.; McSWEENEY, P. L. H.; WALLACE, J. Biochemistry of cheese ripening. In: FOX, P. F. **Cheese: chemistry, physics and microbiology**. Vol. 2, Major cheese groups. London U. K. 1993. Chapman e Hall, 2 ed., p.388-438, 1993.

FRANCO, B.D.G.M.; LANDGRAF, M. **Microbiologia dos alimentos**. São Paulo: Atheneu, 1996. 182p.

FRESNO BARO, J.M. **Controles de producto en la fabricación de quesos**. Comunicação pessoal, Universidad de León. España. 2000.

FURTADO, M.M. **A arte e a ciência do queijo**. 2^o ed. São Paulo: Globo, 295p. 1991.

FURTADO, M.M. **Manual prático da Mussarela (Pizza Cheese)**. Campinas: Master Graf, 70 p. 1997.

FURTADO, M. M.; LOURENÇO NETO, J. P. de. M. **Tecnologia de Queijos – Manual técnico para produção industrial de queijos**. 1. ed. São Paulo-SP: Editora Dipemar Ltda., 1994.

FURTADO, M. M.; MOSQUIM, M. C. A. V.; FERNANDES, A. R.; DA SILVA, C. A. B. Produção de queijo Minas curado e meia-cura. In: DA SILVA, C. A. B.; FERNANDES, A. R. (Ed.) **Projetos de empreendimentos agroindustriais: Produtos de origem animal**. Vol. 1. Viçosa: UFV-MG, ed. UFV, 2003. p. 211-239.

GAYA, P., MEDINA, M., e NUNEZ, M., BAUTISTA, L. e NUNEZ, M. Influence of lactic *starter* inoculation, curd heating and ripening temperatura of *Staphylococcus aureus* behaviour in Manchego cheese. **International Journal Food Microbiology**, v. 6, p. 249-257, 1988.

GENIGEORGIS, C. Present state of knowledge on staphylococcal intoxication. **International Journal of Food Microbiology**, v.9, p.327-360, 1989.

GIAMMARINARO, P., LEROY, S., CHACORNAC, J. P., DELMAS, J., TALON, R. Development of a New Oligonucleotide Array To Identify Staphylococcal Strains at Species Level. **Journal Clinical Microbiology**. v. 43, p. 3673-3680, 2005.

GLOBO RURAL. Queijo: Mineiros Tentam Ajustar Modernidade e Produção Artesanal. **Revista Globo Rural**. Ano 17 Nº 200, junho de 2002.

GOMEZ-LUCIA, E.; GOYACHE, J.; ORDEN, J. A.; DOMENECH, A.; HERNANDEZ, F. J.; QUITERIA, J. A. R. S.; LOPEZ, B.; BLANCO, J. L.; SUAREZ, G. Growth of *Staphylococcus aureus* and Synthesis of Enterotoxin During Ripening of Experimental Manchego-Type Cheese. **Universidad Complutense**, Madrid- Spain, 1986.

GOROSTIZA, A.; CICHOSCKI, A. J.; VALDUGA, A. T.; VALDUGA, E.; BERNARDO, A.; FRESNO, J. M. Changes in soluble nitrogenous compounds, caseins and free amino acids during ripening of artisanal Prato cheese; a Brazilian semi-hard cows variety. **Food Chemistry**. v. 85, 407 - 414. 2004.

GRAPPIN, R.; BEUVIER, E. Possible implications of milk pasteurization on the manufacture and sensory quality of ripening cheese. Review. **International Dairy Journal**. Nº 7, 751 - 761. 1998.

HAJDENWURCEL, J. R. 2002 Produção segura na cadeia alimentar do leite. In: PORTUGAL, J. A. B. et al., (Ed.) **Segurança alimentar na cadeia do leite**. Juiz de Fora-MG: Templo Gráfica e Editora Ltda., 2002. p. 99 – 112

IMA – Instituto Mineiro de Agropecuária. Regulamento Técnico de produção do Queijo Artesanal de Minas Gerais. Superintendência de Segurança Alimentar e Certificação. Disponível em: imanet.ima.mg.gov.br/Documentos_certificacao/formularios/Regulamento%20T%20E9cnico%20de%20QMA-final.pdf (acessado em 10/09/2007)

IMA – Instituto Mineiro de Agropecuária. Portaria nº 517, de 14 junho de 2002 - Estabelece normas de defesa sanitária para rebanhos fornecedores de leite para produção de queijo Minas artesanal. Portaria nº 518, de 14 de junho de 2002 - Dispõe sobre requisitos básicos das instalações, materiais e equipamentos para a fabricação do queijo Minas

artesanal. Portaria nº 523, de 3 de julho de 2002 - Dispõe sobre as condições higiênico-sanitárias e Boas Práticas na Manipulação e Fabricação do queijo Minas artesanal. 2002.

IURLINA, M. O., FRITZ, R. Microbiological quality of Port Salut Argentino cheese stored at two temperature treatments. **LWT**. N.37, p.739-748. 2004.

JAY, J.M., **Microbiologia de alimentos**. 6 ed., Porto Alegre, Artmedia. 2005. 711p.

KINDSTEDT, P. S. Effect of manufacturing factors, composition and proteolysis on the functional characteristics of mozzarella cheese. **Critical Reviews in Foods Science**. v. 33, p. 167 – 187, 1993.

LAW, B. A. Controlled and accelerated cheese ripening: the research base for new technologies. **International Dairy Journal**. v. 11. p. 383 - 398. 2001.

LAWRENCE, R.C.; CREAMER, L.C.; GILLES, J. Texture development during cheese ripening. **Journal of Dairy Science**. v. 70, p.1748-1760, 1987.

LEI ESTADUAL/MG Nº 14.185, de 31 de janeiro de 2002. Dispõe sobre o processo de produção do Queijo Minas Artesanal e dá Outras Providências. Belo Horizonte, 2002.

MACHADO, E. C.; FERREIRA, C.L.F.; FONSECA, L. M. Características Físico-químicas e sensoriais do queijo Minas Artesanal produzido na região do Serro, Minas Gerais. **Revista Ciência e Tecnologia de Alimentos**. Nº24, Vol. 4. p.516-521. Out/Dez, 2004.

MANOLOPOULOU, E., SARANTINOPOULOS, P., ZOIDOU E., AKTYPIS, A., MOSCHOPOULOU E., KANDARAKIS, I. G., ANIFANTAKIS, E. M. Evolution of microbial populations during traditional Feta cheese manufacture and ripening. **International Journal of Food Microbiology**, v. 82, p. 153-161, 2003.

MARCO, F.; ALMELA, M.; NOLLA-SALAS, J.; COLL, P.; GASSER, I.; FERRER, M. D.; DE SIMON, M. In Vitro Activities of 22 Antimicrobial Agents against *Listeria monocytogenes* Strains Isolated in Barcelona – Spain. **Diagnostic Microbiology and Infections Disease**, v. 38, p.259-261, 2000.

MARQUEZAN, A. M. M. **Influência do tipo de coagulante e do aquecimento no cozimento da massa na composição, rendimento, proteólise e características sensoriais do queijo prato**. 204p. 2003. (Doutorado em Tecnologia de Alimentos) - Universidade Estadual de Campinas. Campinas. 2003.

MARTÍN, B.; JOFRÉ, A.; GARREGA, M.; HUGAS, M.; AYMERICH, T. Quantification of *Listeria monocytogenes* in fermented sausages by MPN-PCR method. **Journal in Applied Microbiology**. v. 39, p.290-295, 2004.

MARTINI, M. H.; CHIARINI, P. F. L.; SILVA, C. L. e; DAROS, V. dos S. M. G.; PEREIRA, U.; SAVIGNAMO, L. V. Observações macro e microscópicas de matérias estranhas, segundo denuncia do consumidor, no período de 1997 a 2001 nas regiões de campinas e Santo Andre (SP). **Higiene Alimentar**. v. 18, p.47-49, 2004

MARTINS, F. O.; SILVA, C. A. O.; BRANDÃO, S. C. C. Qualidade microscópica de leite fluido comercializado na região da Zona da Mata de Minas Gerais. **Anais do XXII Encontro Nacional de Analistas de Alimentos (ENAAAL)**. “Novas Tecnologias em Alimentos: Impactos e Riscos a Saúde”. Rio de Janeiro. 2003.

MARTINS, J. M.; PINTO, M. S.; BARBOSA, T. S.; OLIVEIRA, F. A.; OLIVEIRA, R. C.; RIBEIRO JÚNIOR, J. I.; FURTADO, M. M.; FERREIRA, C. L. L. F. Características físico-químicas dos queijos Minas artesanais produzidos na região do Serro. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, v. 59, p. 331 – 334, 2004.

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

MENDONÇA, R. C. S., VIEIRA, E. N. R., OLIVEIRA, K. A. de M. Patógenos na indústria de carnes e derivados. In: Editado [por] Regina Célia Santos Mendonça... [e outros]. **Microbiologia de Alimentos: qualidade e segurança na produção e consumo.** Viçosa-MG: Tribuna Editora Gráfica, p. 21-48, 2003.

MENÉNDEZ, S.; GODINEZ, R.; RODRÍGUEZ-OTERO, J.L.; CENTENO, J.A. Fenómenos bioquímicos durante la maduración del queso. **Alimentación, Equipos y Tecnología**, p.97-105, 1999.

MORGAN, F.; BONNIN, V.; MALLEREAU, M. P.; PERRIN, G. Survival of *Listeria monocytogenes* during the manufactures, ripening and storage of soft lactic cheese made from raw goat milk. **International Journal of food microbiology**, v.64, p.217-221, 2001

MUNDO DO LEITE. Produção, Industrialização e Consumo. **Revista Mundo do Leite.** Nº 04. DBO Editores. Maio de 2003.

NARDES, R. E. F. **Caracterização do queijo Zamorano dop sob condições de maturação acelerada por modificações na temperatura.** 230 p. 2002. (Doutorado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2002

NUÑEZ, M., CHAVARRI, F., GARCIA, B. e GAYATIÁN, L. E. The effect of lactic *starter* inoculation and storage temperature on behavior of *Staphylococcus aureus* and *Enterobacter cloacae* in *Burgos cheese*. **Food Microbiology**. v. 3, p. 235-242, 1986.

OLIVEIRA, A. N. **Bactérias do gênero *Listeria* em leite e derivados no comércio varejista de Goiânia** – Goiás. 1993. (Dissertação, Mestrado em Medicina Veterinária) – Universidade Federal de Minas Gerais. Belo Horizonte. 1993.

ORNELAS, E. A., **Diagnóstico preliminar para caracterização do processo e das condições de fabricação do queijo artesanal da Serra da Canastra-MG.** 65p. 2005. (Mestrado em Medicina Veterinária) - Universidade Federal de Minas Gerais. Belo Horizonte. 2005.

ORWIN, P. M., FITZGERALD, J. R., LEUNG, D. Y., GUTIERREZ, J. A., BOHACH, G.A., SCHLIEVERT, P. M. Characterization of *S. aureus* enterotoxin L. **Infection and immunity**, v. 71, p. 2916-2919, 2003

PAK, S.; SPAHR, U.; JEMMI, T.; SALMAN, M. D. Risk factors for *L. monocytogenes* contamination of dairy products in Switzerland, 1990 - 1999. **Preventive Veterinary Medicine**. v. 53, p. 55 - 65. 2002.

PEREIRA, J. L.; SALZBERG, S. P.; BERGEDOLL, M. S. Production of staphylococcal enterotoxin D in foods by low enterotoxin-production staphylococci. **International Journal of Food Microbiology**, v.14, p. 19-26, 1997

PEREIRA, M. L. Baixa produção de enterotoxinas por estafilococcus coagulase negativos e positivos – Algumas considerações. IN: SIMPOSIO LATINO-AMERICANO DE CIÊNCIAS DE ALIMENTOS, 3., Campinas. **Livro de Programas e Resumos**. Campinas, p. 3, 1999.

PIMENTEL FILHO, N. J.; MARTINS, J. M.; RAMOS, M. P. P.; ROSADO, M. S.; OLIVEIRA, N. P.; CUNHA, L. R.; COSTA, K. F.; FERREIRA, C. L. L. F. Características microscópicas de queijo Minas artesanal da região do Alto Paranaíba. **Revista do Instituto de Laticínios “Cândido Tostes” (ILCT)**. Juiz de Fora. MG. v. 60, Nº 345. p. 298 – 301, 2005.

PINTADO, C. M. B. S.; OLIVEIRA, A.; PAMPULHA, M. E. FERREIRA, M. A. S. S. Prevalence and characterization of *Listeria monocytogenes* isolated from soft cheese. **Food Microbiology**. v. 22, p. 79 - 85, 2005.

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

PINTO, M. S.; MARTINS, J. M.; ARAÚJO, R. A. B. M.; SILVA, M. C. C. da.; FERREIRA, C. L. L. F.; 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.

RANK, T.C.; GRAPPIN, R.; OLSON, N.F. Secondary proteolysis of cheese during ripening: A review. **Journal of Dairy Science**. v. 68, p. 801-807, 1985.

RAPINI, L. S.; SOUZA, R. M. B.; CERQUEIRA, M. M. O. P.; SOUZA, M. R. Qualidade microbiológica da água de propriedades leiterias situada na região metropolitana de Belo Horizonte (MG). **Revista do Instituto de Laticínios Cândido do Tostes**, v.58, n.333. p. 95-98, 2003.

RAPINI, LS.; TEIXEIRA, J.P.; MARTINS, N.E. Perfil antimicrobiano de cepas de *Staphylococcus sp.* isoladas de leite cru de cabra, queijo e manipuladores. **Revista Higiene Alimentar**, v.17, p.162, 2003.

ROBBS, P. G.; CAMPELO, J. C. F. Produção segura na cadeia alimentar do leite. In: PORTUGAL, J. A. B. et al.,. (Ed.) **Segurança alimentar na cadeia do leite**. Juiz de Fora-MG: Templo Gráfica e Editora Ltda., 2002. p. 51-76.

ROSEC, J. P., GUIRAUD, J. P., DALET, C., NICOLE RICHARD. Enterotoxin production by staphylococci isolated from food in France. **International Journal of Food Microbiology**, v. 35, p. 213-221, 1997.

ROSENBERG, M.; WANG, Z.; CHUANG, S.L.; SHOEMAKER, C.F. Viscoelastic property changes in Cheddar cheese during ripening. **Journal of Food Science**. nº 60, p. 640- 644, 1995.

SAMPAIO, I. B. M. Estatística **Aplicada à experimentação animal**. Belo Horizonte: Fundação de Ensino a Pesquisa em medicina Veterinária e Zootecnia, 1998. 221p.

SANTOS, E. C. dos; GENIGEORGIS, C. Potencial for presence and growth of *Staphylococcus aureus* in brazilian Minas cheese whey. **Journal of Food Protection**, n. 3, v. 44, p. 185-188, 1981.

SCHEERER, D.; CORTI, S.; MUEHLHERR, J. E.; ZWEIFEL, C.; STEPHAN, R. Phenotypic and genotypic characteristics of *Staphylococcus aureus* isolates from raw bulk-tank milk samples of goats and sheep. **Veterinary Microbiology**, n. 101, p. 101-07, 2004

SENA, M.J. Perfil epidemiológico, resistência a antibióticos e aos conservantes nisina e sistema lactoperoxidase de *Staphylococcus sp* isolados de queijos coalho comercializados em Recife-PE. Belo Horizonte: UFMG, Escola de Veterinária, 75p. 2000. Tese (Doutorado em Ciência Animal e Tecnologia de Alimentos) – Universidade Federal de Minas Gerais, 2000.

SILVA, C. A. O.; MARTINS, F. O.; BRANDÃO, S. C. C. Avaliação de matérias estranhas em queijo Minas Frescal comercializado na região da Zona da Mata de Minas Gerais. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**. v.59. nº359, p. 398-401, 2004

SILVA, F. T.; GOMES, C. A. O. Segurança alimentar de leite e derivados: Aplicação de BPF e APPCC. IN: PORTUGAL, J. A. B.; CASTRO, M. C. D.; SILVA, P. H. F.; NEVES, B. S.; ARCURI, E. F. (Ed.) **O agronegócio do leite e os alimentos lácteos funcionais**. Juiz de Fora-MG: Templo Gráfica e Editora Ltda., p. 107-150, 2001.

SILVA, N.; JUNQUEIRA, V. C. A.; SILVEIRA, N. F. A. **Manual de Métodos de Análises Microbiológica de Alimentos**. 1. ed. São Paulo-SP: Livraria Varela Ltda., 1997.

SILVA, P. H. F.; PINHEIRO, A. J. R.; GOMES, J. C. PARREIRAS, J. F. M., MOSQUIM, M. C. A. V.; FURTADO, M. M. Desenvolvimento de metodologia analítica para avaliação de proteólise em queijos. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, nº 295, v. 50, p. 15 – 29, 1995.

SOUSA, M. J.; ARDÖ, Y. e McSWEENEY, P. L. H. Advances in the study of proteolysis during cheese ripening. **International Dairy Journal**, v.11, p. 327-345, 2001.

SOUZA, C. F. V.; ROSA, T. D.; AYUB, M. A. Z. Changes in the microbiological and physicochemical characteristics of Serrano cheese during manufacture and ripening. **Brazilian Journal Microbiology**, v. 34, p.260-266, 2003.

SU, YI-CHENG; WONG, L. A. C. Current perspectives on detection of staphylococcal enterotoxins. **Journal of Food Protection**, n.2, v. 60, p 195-202, 1997.

VANETTI, M. C. D. **Microrganismos patogênicos em leite. Microbiologia de Alimentos: qualidade e segurança na produção e consumo**. Editado por Regina Célia Santos Mendonça ... [e outros]. Viçosa, 2003. 209p.

VARNAM, A. H.; SUTHERLAND, J. P. Milk and Milk Products. Technology, Chemistry and Microbiology. Ed. Chapman e Hall. Vol. 1, Food Products Series. 1996.

VERAS, J. F.; SANTOS, D. A. dos; DO CARMO, L. S.; FERNANDES, T. de M. G.; AZALIN, C. C.; SILVA, M. C. C. da; MARTINS, R. T.; CERQUEIRA, M. M. ° P. Levantamento de surtos de toxinfecção alimentar envolvendo leite e produtos derivados no estado de Minas Gerais, Brasil. In: **Anais do VII Congresso Brasileiro de Higienistas de Alimentos**, p. 218-219, 2003.

VERNOZY-ROZAND, C.; MAZUY, C.; PREVOST, G.; LAPEYRE, C.; BES, M; BRUN, Y.; FLERETTE, J. Enterotoxin production by coagulase negative staphylococci isolated from goats' milk in cheese. **International Journal of Food Microbiology**, v. 30, p. 271-280, 1996.

VICENTE, M.S.; IBÁÑEZ, F.C.; BARCINA, Y.; BARRON, L.J.R. Changes in the free amino acid content during ripening of Idiazábal cheese: influence of *starter* and rennet type. **Food Chemistry**, v. 72, p. 309-317, 2001.

VISSER, S. Proteolytic enzymes and their relation to cheese ripening and flavor: an overview. **Journal of Dairy Science**, v. 76, p. 329-350, 1993.

VITAS, A.L.; AGUADO, V.; GARCIA-JALON, L. Occurrence of *Listeria monocytogenes* in Fresh and processed foods in Navarra (Spain). **International Journal of Food Microbiology**, v.90. p.349-356, 2004.

WASTRA, P., NOOMEN, A., e GEURTS, T. J. Dutch – Types Varieties. In: Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology. 2nd. Ed. Aspen Publishers Inc. Maryland. P.39-82, 1999.

WOLFSCHOON-POMBO, A. F. W.; LIMA, A. de. Extensão e profundidade de proteólise em queijos Minas Frescal. **Revista do Instituto Laticínios “Cândido Tostes”**, v. 44, p. 261- 266, 1989.

ROBBINS, R.; GOULD, S.; BERGDOLL, M.S. Detecting the enterotoxigenicity of *Staphylococcus aureus* strains. **Appl. Microbiol.**, v. 28, p. 946-50, 1974.

APÊNDICES

APÊNDICE A

Quadro 1 – Valores médios dos parâmetros de umidade, cloreto de sódio, atividade de água, pH, e acidez titulável do queijo Canastra em função da temperatura de maturação e o período de coleta.

Período de Coleta	Temperatura de maturação	Período de maturação (dias)					
		8	15	22	29	36	64
Umidade (%)							
Águas	Ambiente	45,42 a	39,80 a	32,49 a	28,09 a	22,31 a	20,31 a
	Refrigerado	50,65 b	50,60 b	51,96 b	50,06 b	51,15 b	50,38 b
Seca	Ambiente	44,79 A	40,07 A	34,54 A	28,87 A	25,48 A	20,67 A
	Refrigerado	49,64 B	50,16 B	50,47 B	50,54 B	49,50 B	48,51 B
Cloreto de sódio (%)							
Águas	Ambiente	1,43 a	1,61 a	1,81 a	2,05 a	2,26 a	2,47 a
	Refrigerado	1,44 a	1,49 a	1,54 b	1,56 b	1,41 b	1,69 b
Seca	Ambiente	1,50 A	1,92 A	2,26 A	2,35 A	2,54 A	2,74 A
	Refrigerado	1,55 A	1,57 B	1,67 B	1,78 B	1,79 B	1,76 B
Atividade de água (Aw)							
Águas	Ambiente	0,9819 a	0,9771 a	0,9685 a	0,9584 a	0,9500 a	0,9300 a
	Refrigerado	0,9800a	0,9833 b	0,9832 b	0,9823 b	0,9844 b	0,9810 b
Seca	Ambiente	0,9810 A	0,9729 A	0,9629 A	0,9540 A	0,9434 A	0,9244 A
	Refrigerado	0,9824 A	0,9824 B	0,9813 B	0,9801 B	0,9796 B	0,9795 B
pH							
Águas	Ambiente	5,03 a	5,01 a	5,05 a	5,10 a	5,07 a	5,05 a
	Refrigerado	4,94 a	4,95 a	4,92 b	4,94 b	4,95 b	4,93 b
Seca	Ambiente	5,00 A	5,06 A	5,04 A	5,07 A	5,04 A	5,16 A
	Refrigerado	4,90 B	4,89 B	4,91 B	4,94 B	4,91 B	4,92 B
Acidez Titulável (%)							
Águas	Ambiente	0,76 a	0,64 a	0,55 a	0,48 a	0,57 a	0,66 a
	Refrigerado	0,79 a	0,77 b	0,75 b	0,74 b	0,71 b	0,69 b
Seca	Ambiente	0,67 A	0,67 A	0,70 A	0,80 A	0,78 A	0,97 A
	Refrigerado	0,98 B	1,03 B	1,03 B	1,18 B	0,99 B	1,12 B

Médias seguidas pela mesma letra minúscula e maiúscula, na coluna, não diferem entre si pelo teste F (P>0,05).

APÊNDICE B

Quadro 2 – Valores médios dos parâmetros de gordura, gordura no extrato seco, nitrogênio total, proteína total, nitrogênio solúvel (NS) em pH 4,6 e TCA 12% , índice de profundidade de maturação do queijo Canastra em função da temperatura de maturação e o período de coleta.

Período de Coleta	Temperatura de maturação	Período de maturação (dias)					
		8	15	22	29	36	64
Gordura (%)							
Águas	Ambiente	26,88 a	31,63 a	36,81 a	40,50 a	45,04 a	49,78 a
	Refrigerado	21,25 b	22,35 b	24,56 b	24,25 b	24,29 b	24,33 b
Seca	Ambiente	30,19 A	32,25 A	36,19 A	41,23 A	46,00 A	49,85 A
	Refrigerado	26,06 B	26,25 B	25,85 B	26,00 B	27,00 B	27,69 B
Gordura no extrato seco (%)							
Águas	Ambiente	49,34 a	52,69 a	54,63 a	56,37 a	58,71 a	61,05 a
	Refrigerado	43,08 b	45,33 b	51,29 a	48,76 b	49,95 b	49,25 b
Seca	Ambiente	54,74 A	53,84 A	55,31 A	58,00 A	61,81 A	62,88 A
	Refrigerado	51,88 A	52,68 A	52,33 A	52,59 B	53,56 B	53,92 B
Nitrogênio total (%)							
Águas	Ambiente	3,88a	4,42a	4,84a	5,06a	5,45a	5,84 ^a
	Refrigerado	3,50b	3,47b	3,43b	3,32b	3,37b	3,34b
Seca	Ambiente	3,86A	4,24A	4,47A	4,60A	5,02A	5,34 ^a
	Refrigerado	3,19B	3,24B	3,27B	3,35B	3,38B	3,51B
Proteína total (%)							
Águas	Ambiente	24,75a	28,18a	30,87a	32,30a	34,81 a	37,32 ^a
	Refrigerado	22,29b	22,13b	21,88b	21,19b	21,47b	21,49b
Seca	Ambiente	24,64A	27,03A	28,51A	29,33A	32,00A	34,07 ^a
	Refrigerado	20,36B	20,70B	20,89B	21,37B	21,53B	22,36B
NS pH 4,6							
Águas	Ambiente	0,42a	0,52a	0,63a	0,69a	0,78a	0,79 ^a
	Refrigerado	0,30b	0,33b	0,36b	0,37b	0,40b	0,44b
Seca	Ambiente	0,38A	0,46A	0,51A	0,58A	0,67A	0,75 ^a
	Refrigerado	0,31B	0,32B	0,33B	0,36B	0,33B	0,37B

Médias seguidas pela mesma letra minúscula e maiúscula, na coluna, não diferem entre si pelo teste F (P>0,05).

APÊNDICE C

Quadro 3 – Valores médios dos parâmetros de Extensão de maturação, nitrogênio solúvel em TCA 12% e profundidade de maturação do queijo Canastra em função da temperatura de maturação e o período de coleta.

		Extensão de maturação (%)					
Águas	Ambiente	10,78a	11,79a	12,95a	13,67a	13,66a	14,63 ^a
	Refrigerado	8,64 b	9,58b	10,47b	11,24b	11,93b	13,32b
Seca	Ambiente	9,78A	10,81A	11,38A	12,66A	13,46A	14,00A
	Refrigerado	9,69B	9,84B	10,20B	10,80B	9,90B	10,63B
		NS TCA 12%					
Águas	Ambiente	0,26a	0,35a	0,46a	0,51a	0,59a	0,67 ^a
	Refrigerado	0,20b	0,22b	0,23b	0,25b	0,26b	0,30b
Seca	Ambiente	0,21A	0,27A	0,33A	0,40A	0,49A	0,55 ^a
	Refrigerado	0,17B	0,17B	0,18B	0,20B	0,21B	0,23B
		Profundidade de maturação (%)					
Águas	Ambiente	6,72a	8,06a	9,58a	10,15a	11,29 a	12,43 ^a
	Refrigerado	5,87b	6,48b	6,75b	7,51b	7,88b	8,93b
Seca	Ambiente	5,37A	6,26A	7,45A	8,65A	9,86A	10,26 ^a
	Refrigerado	5,29B	5,10B	5,46B	5,97B	6,22B	6,60B

APÊNDICE D

Quadro 4 – Tipo e quantidade de material estranho encontrado e amostras de queijos Minas artesanais da região da Canastra, produzido no período das águas e da seca

Material estranho	Número de produtores/ Quantidade de material estranho								TOTAL
	1	2	3	4	5	6	7	8	
Tipos									
Elemento histológico vegetal	17	12	35	20	22	30	25	26	187
Pontos escuros	87	58	101	82	53	92	60	51	584
Fragmento de insetos	2	1	0	0	0	0	1	0	4
Fragmento de madeira	2	3	0	2	1	1	0	3	12
Material terroso / pontos marrons	19	15	55	20	38	50	32	21	250
Pêlo bovino / rato / cão	1	2	1	0	1	3	2	1	11
Pêlo humano	1	2	5	2	1	1	1	1	14
Fragmentos de tecidos	3	3	5	2	2	7	3	2	27
Total de material estranho/produtor	132	96	202	128	118	184	124	105	1.089
Total geral de material estranho									1.089
Elemento histológico vegetal	21	17	65	30	32	55	56	42	318
Pontos escuros	88	85	131	102	70	140	54	66	736
Fragmento de insetos	0	1	0	0	1	2	5	2	11
Fragmento de madeira	5	4	5	6	3	3	2	5	33
Material terroso / pontos marrons	69	72	96	120	80	85	46	30	598
Pêlo bovino / rato / cão	5	3	12	3	4	5	9	10	51
Pêlo humano	4	5	6	3	3	3	4	5	33
Fragmentos de tecidos	5	20	10	9	8	8	5	10	75
Total de material estranho/produtor	197	207	325	273	201	301	181	170	1.855
Total geral de material estranho									1.855