

VIVIANE DA CRUZ RAFAEL

**FENÓTIPOS DA MICROBIOTA PREDOMINANTE DO FERMENTO
ENDÓGENO (PINGO) RELEVANTES PARA AS CARACTERÍSTICAS E
SEGURANÇA MICROBIOLÓGICA DO QUEIJO MINAS ARTESANAL DA
SERRA DA CANASTRA**

Tese 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 *Doctor Scientiae*.

VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2017

**Ficha catalográfica preparada pela Biblioteca Central da Universidade
Federal de Viçosa - Câmpus Viçosa**

T

R136f
2017

Rafael, Viviane da Cruz, 1987-

Fenótipos da microbiota predominante do fermento
endógeno (pingo) relevantes para as características e segurança
microbiológica do queijo Minas artesanal da Serra da Canastra /
Viviane da Cruz Rafael. – Viçosa, MG, 2017.
xviii, 138f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Inclui anexos.

Orientador: Célia Lúcia de Lucas Fortes Ferreira.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa.

Inclui bibliografia.

1. Queijo - Processamento. 2. Queijo - Fermentação.
3. Bactérias lácticas. 4. Microbiologia. I. Universidade Federal de
Viçosa. Departamento de Tecnologia de Alimentos. Programa de
Pós-graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos. II. Título.

CDD 22 ed. 641.02

VIVIANE DA CRUZ RAFAEL

**FENÓTIPOS DA MICROBIOTA PREDOMINANTE DO FERMENTO
ENDÓGENO (PINGO) RELEVANTES PARA AS CARACTERÍSTICAS E
SEGURANÇA MICROBIOLÓGICA DO QUEIJO MINAS ARTESANAL DA
SERRA DA CANASTRA**

Tese 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 *Doctor Scientiae*.

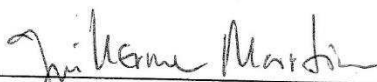
APROVADA: 04 de agosto de 2017



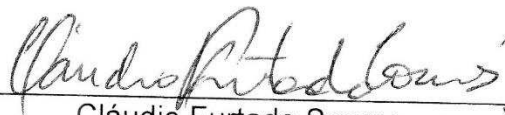
Monique Renon Eller
(Coorientador)



Ramila Cristiane Rodrigues



José Guilherme Prado Martin



Cláudio Furtado Soares



Célia Lúcia de Lucas Fortes Ferreira
(Orientador)

“Talvez não tenha conseguido fazer o melhor, mas lutei para que o melhor fosse feito. Não sou o que deveria ser, mas Graças a Deus, não sou o que era antes”.

(Marthin Luther King)

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, por me permitir viver tamanha realização e por ser o meu refúgio nos momentos que eu mais precisei.

À minha mãe que diante dos meus momentos de desespero, teve parcimônia para me acalmar e me mostrar que para Deus nada é impossível. Ao meu pai por me ensinar a ser uma pessoa responsável, íntegra e batalhadora. Às minhas irmãs por sempre me apoiarem e incentivarem. Ao meu noivo Erick, que acompanhou de perto toda a minha trajetória nesses 13 anos de relacionamento, me dando força, incentivo e me mostrando do que eu sou capaz com toda a paciência do mundo. Amo muito vocês, vocês são essenciais em minha vida! Aos meus sogros e cunhados que também fazem parte da família.

A Universidade Federal de Viçosa, em particular, ao Departamento de Tecnologia de Alimentos, e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de estudos.

A professora Célia pela orientação e pelos ensinamentos compartilhados.

Às professoras Ana Clarissa e Monique pela coorientação e por terem sido sempre muito prestativas e pacientes, sempre me acalmando nos meus momentos de desespero. Ao professor José Guilherme pela disponibilidade em me receber e me auxiliar para a conclusão deste trabalho. Ao professor Cláudio Furtado por sempre atender prontamente aos meus chamados e pela boa vontade e disponibilidade de participar dessa banca. À Ramila Rodrigues que foi extremamente atenciosa e solícita em aceitar o meu convite, mesmo sendo em cima da hora;

A todos os produtores da Serra da Canastra que abriram as portas de suas propriedades para nos receber com todo o carinho e confiança do mundo;

Ao professor Jonas Guimarães e Silva do Instituto Federal de Minas Gerais – Campus Bambuí, que foi imprescindível para o desenvolvimento dessa pesquisa, intermediando o contato com os produtores e até mesmo auxiliando na coleta de amostras;

Aos técnicos do Instituto Mineiro de Agropecuária (IMA) e Empresa de Assistência Técnica e Extensão Rural (EMATER) por toda colaboração durante a realização desse trabalho;

A todos os funcionários do Departamento de Tecnologia de Alimentos, principalmente ao Célio, Lorena, Marcos e Gustavo que estavam sempre dispostos a ajudar.

A todos que passaram pelo Laboratório de Culturas Láticas, em especial à Driene e Érika, que me deram todo apoio nesses últimos momentos, escutando meus lamentos e choros (e olha que não foram poucos) e por tornarem o dia-a-dia no laboratório mais divertido.

Aos amigos que o DTA me deu, em especial à Maura, Miriane e Joice, que mesmo não tendo mais tanta convivência, são mais que especiais para mim.

Por último, porém não menos importante, aos meus queridos estagiários, Claudenilson, Amanda, Gabriela, Lucas, Larissa, Joyce e Monique. Sem vocês esse trabalho não seria possível.

Meus mais sinceros agradecimentos a todos que de alguma forma contribuíram para que eu alcançasse mais essa vitória.

BIOGRAFIA

VIVIANE DA CRUZ RAFAEL, filha de Vicente Alves Rafael e Maria das Dores da Cruz Rafael, nasceu em Viçosa, Minas Gerais, em 27 de fevereiro de 1987.

Em março de 2007 iniciou o curso de Graduação em Ciência e Tecnologia de Laticínios pela Universidade Federal de Viçosa, diplomando-se em julho de 2011. Em agosto deste mesmo ano ingressou no Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos da Universidade Federal de Viçosa, submetendo-se à defesa de dissertação em março de 2013.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS	ix
LISTA DE FIGURAS	xi
LISTA DE QUADROS	xiii
LISTA DE TABELAS	xiv
RESUMO	xv
ABSTRACT	xvii
INTRODUÇÃO GERAL	1
OBJETIVOS	2
Objetivo geral	2
Objetivo específicos	2
CAPÍTULO 1 - REVISÃO DE LITERATURA	4
1. QUEIJO MINAS ARTESANAL	4
1.1. Produção de Queijo Minas Artesanal	5
1.2. Regulamentação do Queijo Minas Artesanal	7
1.3. Microbiota do Queijo Minas Artesanal	8
1.4. Maturação dos queijos	9
1.5. Papel da microbiota do leite na produção de QMA	10
2. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	19
CAPÍTULO 2 – DIAGNÓSTICO DO PROCESSO DE FABRICAÇÃO DE QMA NA REGIÃO DA SERRA DA CANASTRA	30
1. INTRODUÇÃO	30
2. METODOLOGIA	32
2.1. Método diagnóstico - pesquisa in loco	32
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	33
3.1. Caracterização dos produtores	33
3.2. Obtenção da matéria-prima	37
3.3. Sobre as instalações das queijarias	39
3.4. Aspectos relacionados à saúde e higiene do queijeiro	40
3.5. Processo produtivo de QMA	42
3.6. Embalagem	45
3.7. Impressão Global	46
4. CONCLUSÃO	47
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	48
CAPÍTULO 3 – CARACTERIZAÇÃO MICROBIOLÓGICA E FÍSICO-QUÍMICA DO FERMENTO ENDÓGENO UTILIZADO NA PRODUÇÃO DE QMA DA SERRA DA CANASTRA	50
1. INTRODUÇÃO	50

2. METODOLOGIA	52
2.1. Coleta das amostras	52
2.2. Análises microbiológicas dos pingos	52
2.3. Análises físico-químicas dos pingos	52
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	53
4. CONCLUSÃO	58
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	59
CAPÍTULO 4 – ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DA MICROBIOTA CULTIVÁVEL PREDOMINANTE DO PINGO DA SERRA DA CANASTRA	62
1. INTRODUÇÃO	62
2. METODOLOGIA	64
2.1. Coleta de amostras	64
2.2. Isolamento de grupos microbianos do “pingo”	64
2.3. Extração do DNA	65
2.4. REP-PCR	65
2.5. Seleção dos isolados para identificação	66
2.6. Amplificação do gene 16S rDNA dos isolados selecionados	66
2.7. Análise das sequências	67
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	67
3.1. Características fenotípicas e identificação de isolados em meio ASM	67
3.2. Características fenotípicas e identificação dos isolados de Bactérias do ácido láctico	71
4. CONCLUSÃO	80
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	82
CAPÍTULO 5 - PAPEL DA MICROBIOTA DO FERMENTO ENDÓGENO (PINGO) UTILIZADO NA FABRICAÇÃO DO QUEIJO CANASTRA NO ANTAGONISMO A PATÓGENOS INDICADORES DE QUALIDADE	89
1. INTRODUÇÃO	89
2. METODOLOGIA	91
2.1. Teste de atividade antagonista	91
2.2. Teste de produção de diacetil	92
2.3. Teste de atividade proteolítica dos isolados de BAL	92
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	92
4. CONCLUSÃO	105
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	107
CONCLUSÕES GERAIS	114
ANEXOS	116
ANEXO I - Questionário queijo Minas artesanal: condições de processamento	116

ANEXO II - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.....	128
ANEXO III – Parecer consubstanciado do CEP.....	132
ANEXO IV – Dendograma derivado da rep-PCR de bactérias do ácido lático isoladas nos meios MRS e M17	135

LISTA DE ABREVIATURAS

µL – microlitro

ASM – Agar Sal Manitol

BAL – Bactéria (s) do Ácido Lático

BHI – “Brain Heart Infusion” – Infusão de cérebro e coração

BPF – Boas práticas de fabricação

EMATER – Empresa de Assistência Técnica e Extensão Rural do Estado de Minas Gerais

g – Grama

IMA – Instituto Mineiro de Agropecuária

IPHAN – Instituto de Patrimônio Histórico e Artístico Nacional

LDR – Leite desnatado reconstituído

Log – Logaritmo

MAPA – Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento

MG – Minas Gerais

min – minuto

mL – mililitro

mm – milímetro

MRS – deMan, Rogosa e Sharpe

nm – nanômetro

NSLAB – “Non Starter Lactic Acid Bacteria” – Bactérias do ácido lático não iniciadoras

pb – Pares de bases

PCA – “Plate Count Agar” – Agar para contagem em placas

QMA – Queijo Minas Artesanal

SCN - Staphylococcus Coagulase Negativa

SCP - Staphylococcus Coagulase Positiva

SIF – Sistema de Inspeção Federal

Sinan - Sistema de Informação de Agravos de Notificação

SISBI/POA - Sistema Brasileiro de Inspeção de Produtos de Origem Animal

SLAB – “Starter Lactic Acid Bacteria” – Bactérias do ácido láctico iniciadoras

SVS/MS - Secretaria de Vigilância em Saúde, do Ministério da Saúde

UFC – Unidades Formadoras de Colônias

UFVCC – Coleção de culturas da Universidade Federal de Viçosa

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 1

Figura 1 – Regiões produtoras de queijo no Estado de Minas Gerais

Figura 2 – Região produtora de queijo Canastra

Figura 3- Percentual de surtos ocorridos no Brasil de 2007 a 2016* por patógeno.

Figura 4 – Percentual de surtos ocorridos no Brasil de 2007 a 2016* por alimento envolvido.

CAPÍTULO 2

Figura 1 – Faixa etária dos produtores e o tempo que os mesmos exercem a atividade de produção de QMA na região da Serra da Canastra

Figura 2 – Produção diária de QMA por município

Figura 3 – Formas de comercialização dos QMA da Serra da Canastra

Figura 4 – Tamanho do rebanho dos produtores da Serra da Canastra em percentual

Figura 5 – Tipos de criações das fazendas e a distância que as mesmas se encontram das queijarias da região da Serra da Canastra

Figura 6 – Forma de direcionamento que os produtores de Queijo Minas Artesanal da Serra da Canastra receberam para implementação das BPF

Figura 7 – Esquema de produção de Queijo Minas artesanal produzido na região da Serra da Canastra

Figura 8 – Destino do QMA contaminado

CAPÍTULO 5

Figura 1 - Formação de halo (diâmetro em mm) no teste de antagonismo de isolados do fermento endógeno utilizado na fabricação do QMA da Serra da Canastra

Figura 2– Antagonismo (diâmetro dos halos de inibição em mm) em ágar MRS e MRS tamponado de microrganismos predominantes em fermentos endógenos utilizados na produção de QMA da Serra da Canastra isolados em meio MRS (DE MAN, ROGOSA, SHARPE, 1960) contra patógenos indicadores (n=41 isolados).

Figura 3 - Antagonismo (diâmetro médio dos halos de inibição em mm) em ágar MRS e MRS tamponado de *Lactobacillus paracasei* e *Lactobacillus plantarum* isolados em meio MRS a partir de fermentos endógenos utilizados na produção de QMA da Serra da Canastra contra patógenos indicadores (n=41 isolados).

Figura 4 –Antagonismo (diâmetro dos halos de inibição em mm) em ágar MRS e MRS tamponado de microrganismos predominantes em fermentos endógenos utilizados na produção de QMA da Serra da Canastra isolados em meio M17 (TERZAGHI, SANDINE, 1975) contra patógenos indicadores (n=8 isolados).

Figura 5 –Antagonismo (diâmetro médio dos halos de inibição em mm) em ágar MRS e MRS tamponado de *Lactobacillus rhamnosus* e *Lactobacillus plantarum* isolados em meio M17 a partir de fermentos endógenos utilizados na produção de QMA da Serra da Canastra contra patógenos indicadores (n=8 isolados).

LISTA DE QUADROS

CAPÍTULO 4

Quadro 1 – Características de Gram, atividade de catalase e fermentação de manitol de microrganismos predominantes isolados no meio Ágar Sal Manitol (ASM) de amostras do fermento endógeno utilizado na produção do QMA da Serra da Canastra.

Quadro 2 – Características de Gram e atividade de catalase de microrganismos predominantes isolados nos meios MRS* e M17** de amostras do fermento endógeno utilizado na produção do QMA da Serra da Canastra.

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 1

Tabela 1 – Surto relacionados ao consumo de queijos em diversos países.

CAPÍTULO 2

Tabela 1 – Diferentes destinos dos QMA produzido na região da Serra da Canastra.

Tabela 2 – Participação dos produtores da Serra da Canastra em treinamentos relacionados à produção de queijos.

Tabela 3 - Aspectos relacionados ao uso de vestuário adequado para produção de Queijo Minas Artesanal produzido na Serra da Canastra.

CAPÍTULO 3

Tabela 1 - Valores de pH, acidez, cloreto de sódio, média e coeficiente de variação (CV) dos pingos utilizados para fabricação de queijo Minas artesanal da Serra da Canastra.

Tabela 2 – Contagem de microrganismos mesofílicos e bactérias lácticas (log UFC.mL⁻¹) média das contagens e coeficiente de variação (CV) dos pingos utilizados para fabricação de queijo Minas artesanal da Serra da Canastra.

Tabela 3 – Contagem de microrganismos indicadores de qualidade (log UFC.mL⁻¹), média das contagens e coeficiente de variação (CV) dos pingos utilizados para fabricação de queijo Minas artesanal da Serra da Canastra.

CAPÍTULO 4

Tabela 1 – Espécies isoladas do pingo utilizado na fabricação do QMA da Serra da Canastra em meio ASM (Agar Sal Manitol) e prevalência de identificação.

Tabela 2 - Bactérias do ácido láctico (gênero/espécie) isoladas do pingo utilizado na fabricação do QMA da Serra da Canastra, MG isoladas em ágar MRS* e M17**.

Tabela 3 – Identificação e agrupamento das bactérias lácticas isoladas nos meios MRS e M17

CAPÍTULO 5

Tabela 1 – Percentual de redução, aumento ou manutenção do antagonismo (diâmetro dos halos em mm) após o tamponamento do meio MRS no teste de antagonismo dos 49 isolados de bactérias em meios MRS e M17.

RESUMO

RAFAEL, Viviane da Cruz, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, agosto de 2017. **Fenótipos da microbiota predominante do fermento endógeno (pingo) relevantes para as características e segurança microbiológica do queijo Minas artesanal da Serra da Canastra.** Orientador: Célia Lúcia de Luces Fortes Ferreira. Coorientadores: Ana Clarissa dos Santos Pires e Monique Renon Eller.

Neste estudo foram avaliadas as condições de processamento dos queijos Minas artesanais (QMA) da Serra da Canastra por meio de questionário semiestruturado, que foi aplicado a 20 produtores cadastradas ao Instituto Mineiro de Agropecuária (IMA). Nas respectivas propriedades, foram coletadas amostras de pingo, fermento endógeno utilizado na região, as quais foram avaliadas quanto a aspectos físico-químicos e microbiológicos. Com o propósito de conhecer o papel da microbiota predominante do pingo foram utilizados os meios MRS e M17 para isolamento de bactérias lácticas e meio ASM para isolar bactérias do gênero *Staphylococcus*. Os 295 isolados foram caracterizados fenotipicamente (morfologia, gram, catalase). O DNA total de cada isolado foi extraído e pela técnica de REP-PCR, os isolados dos meios MRS e M17 foram agrupados. Com a união das análises fenotípicas e genotípicas foi possível selecionar e identificar por meio do sequenciamento do gene 16S rDNA, 89 isolados. Após os resultados do sequenciamento e o agrupamento pela REP-PCR, 49 isolados dos meios MRS e M17 foram selecionados e avaliados quanto à capacidade de inibir o crescimento de patógenos indicadores de qualidade (*Escherichia coli* ATCC 11229, *Staphylococcus aureus* ATCC 13565, *Listeria monocytogenes* ATCC 15313 e *Salmonella Enteritidis* ATCC 13076) em meio tamponado (neutralizar o efeito dos ácidos orgânicos produzidos pelas bactérias) e não tamponado. A importância da atividade queijeira foi confirmada pelos resultados da entrevista estruturada que também permitiu constatar que a maioria das propriedades (80%) atendiam aos requisitos das boas práticas de fabricação (BPF), com ausência de focos de insalubridade nos locais de produção e adjacências. Nas 20 amostras do pingo analisados, o pH variou de 4,21 a 5,62, a acidez titulável de 0,24 a 1,18% de ácido láctico e o teor de sal de 1,91 a 4,90%, o que evidencia a diversidade do fermento endógeno entre as propriedades de uma mesma região. Apesar das diferenças físico-químicas, as

análises microbiológicas mostraram que todas as amostras do pingo apresentaram prevalência de bactérias do ácido láctico e ausência de *E. coli*. A presença de *S. aureus* foi detectada em 40% das amostras, com contagens variando de 1,57 a 3,18 log UFC.g⁻¹. Após a seleção, 89 isolados foram enviados para sequenciamento de parte do gene 16s rDNA. Os isolados obtidos do meio de cultura ASM foram identificados predominantemente como *Enterococcus faecalis* (42). Embora o meio ASM seja utilizado para isolamento de *S. aureus*, nenhum isolado foi identificado como sendo dessa espécie, apenas dois isolados identificados como pertencentes ao gênero *Staphylococcus* (*S. warneri* e *S. xylosus*). Dentre os 42 isolados dos meios MRS e M17 enviados para sequenciamento, 15 foram identificados erroneamente, uma vez que a morfologia difere do gênero identificado, e, portanto, será necessária uma identificação definitiva posteriormente. Doze isolados não foram passíveis de identificação devido a presença de “ruídos” dos quais, ao serem excluídos resultou em sequências pequenas e com baixa similaridade com o banco de dados. Dos 15 isolados restantes, todos pertencem ao gênero *Lactobacillus*, sendo *Lactobacillus plantarum* (13), *L. paracasei* (1) e *L. rhamnosus* (1). As bactérias lácticas isoladas do pingo apresentaram atividade antagonista sobre os patógenos indicadores (*E. coli*, *L. monocytogenes*, *S. Enteritidis* e *S. aureus*). O antagonismo realizado em meio tamponado, em que o efeito dos ácidos foi neutralizado, promoveu redução no tamanho dos halos produzidos por mais de 55% dos isolados. A atividade proteolítica foi observada em 89,9% dos isolados e 91,8% foram apresentaram capacidade de produzir diacetil, o que pode ter contribuído para o antagonismo observado. O presente estudo reforça a produção de QMA como uma atividade familiar responsável pelo sustento de diversas famílias do Estado de Minas Gerais e enfatiza a importância do pingo na segurança microbiológica dos mesmos. Por apresentar microbiota endógena composta predominantemente por bactérias lácticas, que se mostraram eficazes na inibição de microrganismos patogênicos indicadores de qualidade, o pingo é imprescindível para tornar os queijos seguros para o consumo após período adequado de maturação.

ABSTRACT

RAFAEL, Viviane da Cruz, D.Sc. Universidade Federal de Viçosa, August, 2017. **Phenotypes of the predominant microflora of the endogenous ferment (pingo) relevant to the characteristics and microbiological safety of artisanal Minas cheese of Serra da Canastra.** Advisor: Célia Lúcia de Luces Fortes Ferreira. Co-advisors: Ana Clarissa dos Santos Pires and Monique Renon Eller.

In this study was evaluated as processing conditions of artisanal Minas cheese (AMC) of Serra da Canastra by means of a semistructured questionnaire, which was applied to 20 producers registered at the Instituto Mineiro de Agropecuária (IMA). In the respective properties, samples of pingo, endogenous culture used in the region were collected and evaluated for physical-chemical and microbiological aspects. With the purpose of knowing the role of the predominant microbiota of pingo, MRS and M17 media were used to isolate lactic acid bacteria and ASM medium to isolate bacteria of the genus *Staphylococcus*. The 295 isolates were characterized phenotypically (morphology, gram, catalase). The Total DNA from each isolate extracted and by the REP-PCR technique, isolated from the MRS and M17 media were pooled. With a combination of phenotypic and genetic analyzes it was possible to select and identify by means of 16S rDNA gene sequencing, 89 isolates. After obtaining the result and grouping by REP-PCR, 49 isolates of MRS and M17 media were selected and evaluated for the ability to inhibit the growth of quality indicator pathogens (*Escherichia coli* ATCC 11229, *Staphylococcus aureus* ATCC 13565, *Listeria monocytogenes* ATCC 15313 and *Salmonella* Enteritidis ATCC 13076) in buffered medium (neutralize the effect of organic acids produced by bacteria) and unbuffered. The importance of the cheesemaking activity was confirmed by the results of the structured interview, which also showed that most of the properties (80%) met the requirements of Good Manufacturing Practices (GMP), with no focus of insalubrity at production sites and adjacent areas. In the 20 samples of the pingo analyzed, the pH ranged from 4.21 to 5.62, a titratable acid of 0.24 to 1.18% of lactic acid and salt content of 1.91 to 4.90%, which evidences the diversity of the endogenous ferment among the properties of the same region. Despite the physico-chemical differences, the microbiological analyzes showed how all the

samples of the pingo presented prevalence of lactic acid bacteria and absence of *E. coli*. The presence of *S. aureus* was detected in 40% of the samples, with counts ranging from 1.57 to 3.18 log UFC.g⁻¹. After selection, 89 isolates were sent for sequencing of part of the 16s rDNA gene. The isolates obtained from the ASM medium were identified predominantly as *Enterococcus faecalis* (42). Although the ASM medium was used for *S. aureus* isolation, no isolates were identified as being of this species, only two isolates identified as belonging to the genus *Staphylococcus* (*S. warneri* and *S. xylosus*). Of the 42 isolates of the MRS and M17 media sent for sequencing, 15 were erroneously identified, since the morphology differs from the genus identified, and therefore isn't a definitive identification. Twelve isolates were not identifiable due to the presence of "noises", which, when excluded, resulted in small sequences with low similarity to the database. Of the 15 remaining isolates, all belong to the genus *Lactobacillus*, being *Lactobacillus plantarum* (13), *L. paracasei* (1) and *L. rhamnosus* (1). The isolated lactic acid bacteria showed antagonistic activity on the indicator pathogens (*E. coli*, *L. monocytogenes*, *S. Enteritidis* and *S. aureus*). The antagonism carried out in buffered media, in which the effect of the acids was neutralized, promoted a reduction in the size of the halos produced by more than 55% of the isolates. The proteolytic activity was observed in 89.9% of the isolates and 91.8% were able to produce diacetyl, which may have contributed to the observed antagonism. The present study reinforces the production of QMA as a family activity responsible for the sustenance of several families in the State of Minas Gerais and emphasizes the importance of the pingo in the microbiological safety of the same. Due to the presence of endogenous microbiota composed predominantly of lactic bacteria, which proved to be effective in inhibiting pathogenic microorganisms quality indicators, are essential to make cheeses safe for consumption after an adequate maturation period.

INTRODUÇÃO GERAL

A fabricação de queijos artesanais no Estado de Minas Gerais é uma tradição passada por gerações como forma de aproveitar a produção leiteira em pequenas propriedades rurais. Os queijos Minas artesanais (QMA) são produzidos atualmente nas regiões de Araxá, Campo das Vertentes, Serra do Salitre, Cerrado, Serro, Triângulo Mineiro e Canastra (IMA, 2017).

A região da Serra da Canastra está situada no sudoeste de Minas Gerais, sendo reconhecida como produtora de queijos Minas Artesanais (QMA) por mais de dois séculos. Desde maio de 2008, o queijo Canastra é considerado pelo Instituto do Patrimônio Histórico e Artístico Nacional (IPHAN) como patrimônio cultural imaterial brasileiro (IPHAN, 2008).

O QMA da Serra da Canastra, assim como os queijos artesanais produzidos nas demais regiões, é fabricado com leite cru recém-ordenhado e utiliza o pingo como fermento endógeno (LIMA et al., 2009; OLIVEIRA, 2010).

O leite cru apresenta uma microbiota complexa, podendo apresentar microrganismos desejáveis como bactérias lácticas e, indesejáveis como deterioradores e patógenos. Essa microbiota é carregada ao pingo, uma porção do soro proveniente da dessoragem dos queijos durante a salga, quando os mesmos são mantidos enformados sobre uma bancada de um dia para o outro. Esse soro (pingo) é recolhido no fim do dia de fabricação e adicionado ao leite do dia seguinte, antes da adição do coalho, para uma nova produção de queijo (LIMA et al., 2009; OLIVEIRA, 2010, CARDOSO et al., 2015). As bactérias lácticas predominantes, tanto no leite cru como no pingo, são responsáveis por iniciar e manter o processo fermentativo por meio da rápida produção de ácido, o que resulta na redução do pH e, conseqüentemente, precipitação das proteínas, além produzirem substâncias antimicrobianas que acumulam no meio como ácidos orgânicos (KASHKET, 1987; LORCA, VALDEZ, 2009), peróxido de hidrogênio (DAECHEL, 1989; REID, 2008), diacetil (LANCIOTTI et al., 2003) e bacteriocinas (ROGELJ; BOGOVIČ-MATIJAŠIČ, 1994; COTTER et al., 2005), que são capazes de inibir microrganismos patogênicos.

Em queijos, a presença de patógenos contaminantes constitui um risco para a saúde do consumidor. Em QMA, o patógeno de maior interesse é *Staphylococcus aureus*, por ser capaz de permanecer por mais tempo em

contagens acima do permitido por lei ($2 \log \text{UFC.g}^{-1}$) (MINAS GERAIS, 2008), sendo, portanto, o patógeno responsável por determinar o período mínimo de maturação desses queijos nas diversas regiões produtoras. Na região da Serra da Canastra, a legislação vigente exige a maturação por no mínimo de 22 dias antes de serem comercializados (IMA, 2013). Porém, para que os queijos possam ser comercializados legalmente, as unidades produtoras precisam estar cadastradas junto ao Instituto Mineiro de Agropecuária (IMA) e terem implementadas as BPF e BPA, visando a obtenção de queijos microbiologicamente seguros para consumo, sem afetar as características artesanais do produto.

O objetivo do estudo foi avaliar a conformidade das exigências ao cadastramento nas propriedades cadastradas ao IMA (Instituto Mineiro de Agropecuária), por meio de questionário, uma vez que tais condições podem afetar a qualidade microbiológica dos QMA. O estudo visou ainda determinar as características físico-químicas e microbiológicas do pingo e conhecer e avaliar o papel da microbiota endógena desse fermento na segurança microbiológica do QMA produzido em propriedades cadastradas na região da Serra da Canastra, MG.

OBJETIVOS

Objetivo geral

Caracterizar o pingo quanto às características físico-químicas e microbiológicas e avaliar o papel da microbiota endógena predominante nesse fermento na segurança do QMA produzido em propriedades cadastradas ao IMA (Instituto Mineiro de Agropecuária) na região da Canastra, MG.

Objetivo específicos

- I. Avaliar a qualidade do processamento e as características econômicas e sociais nas unidades cadastradas produtoras do QMA da Canastra.
- II. Caracterizar o pingo quanto aos aspectos físico-químicos e microbiológicos do fermento endógeno da Serra da Canastra.

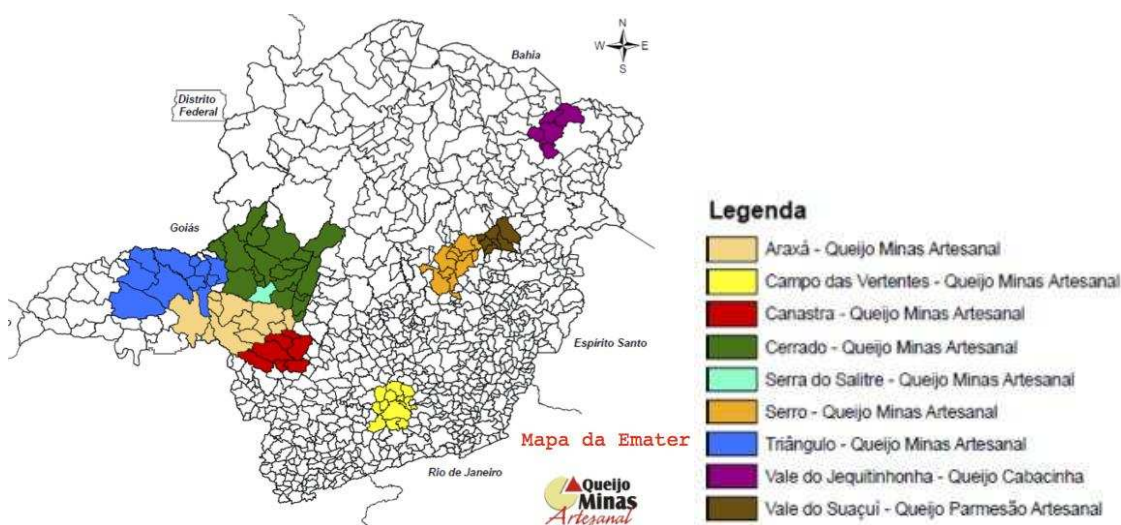
- III. Isolar bactérias predominantes no fermento endógeno da Serra da Canastra.
- IV. Avaliar o antagonismo dos isolados contra os principais patógenos indicadores de qualidade de queijos.
- V. Identificar genotipicamente as bactérias predominantes no pingo em diferentes meios de cultura.

CAPÍTULO 1 - REVISÃO DE LITERATURA

1. QUEIJO MINAS ARTESANAL

Em Minas Gerais, a produção queijeira teve seu início no século XVIII sendo marcada pela corrida do ouro, quando a cultura foi trazida por imigrantes portugueses que fabricavam queijos na Serra da Estrela em Portugal. No estado de Minas, o modo artesanal de produção se desenvolveu e permaneceu principalmente na cidade do Serro e na região da Serra da Canastra. Trata-se uma atividade tradicional que engloba vários municípios e que é responsável pela identidade cultural do Estado, além de apresentar participação expressiva na economia (SANTOS, CRUZ, MENASCHE, 2012).

Atualmente, existem sete regiões reconhecidas como tradicionais produtoras de Queijo Minas artesanal (QMA): Araxá, Campo das Vertentes, Canastra, Cerrado, Serra do Salitre, Serro e Triângulo Mineiro conforme mostrado na Figura 1 (IMA, 2017).



Fonte: <http://www.sertaobras.org.br>

Figura 1 – Regiões produtoras de queijo artesanal no Estado de Minas Gerais

O estado de Minas Gerais foi onde o queijo artesanal se firmou mais intensamente ao longo de sua história, tornando-se uma herança cultural passada de geração em geração (SANTOS, CRUZ, MENASCHE, 2012). Em 2008, o “modo artesanal de fazer queijo de Minas” nas regiões do Serro e das Serras da Canastra e do Salitre foi reconhecido como Patrimônio Cultural

Imaterial Brasileiro pelo IPHAN - Instituto do Patrimônio Histórico e Artístico Nacional (IPHAN, 2008).

O QMA é definido como o produto elaborado, conforme a tradição histórica e cultural da região do Estado onde for produzido, a partir do leite cru, hígido, integral, recém ordenhado, retirado e beneficiado na propriedade de origem e que, ao final, apresente todas as características físico-químicas, microbiológicas, sensoriais e de textura dos queijos artesanais (IMA, 2002). Apresenta como características a coloração amarelo-pálido, o formato cilíndrico, semiduro e com média umidade (36 a 45,9 %) (NOGUEIRA et al., 2005).

A tecnologia de produção dos QMA é basicamente a mesma em todo o território Mineiro, entretanto durante a prensagem manual dos queijos, uma peculiaridade resulta em características próprias dos queijos produzidos em regiões diferentes. Os produtores das regiões de Araxá, Canastra, Cerrado (Alto Paranaíba e Salitre) e Campos das Vertentes utilizam um tecido que contribui para a prensagem, diferente dos produtores da região do Serro que realizam a prensagem sem utilizarem esse tecido (EMATER, 2003; DORES et al., 2013; MARTINS et al., 2015).

Estudos anteriores ao cadastramento indicaram que a presença ou não do tecido durante a prensagem influencia no período mínimo de maturação dos queijos, tendo definido 17 dias para os queijos do Serro (prensagem sem tecido) (MARTINS, 2006) e 22 dias para a Canastra (prensagem com tecido) (DORES, 2007).

Esses estudos forneceram subsídios para a Portaria nº 1305, que entrou em vigor em 30 de abril de 2013, permitindo a comercialização dos queijos com os períodos de maturação especificados anteriormente (IMA, 2013).

1.1. Produção de Queijo Minas Artesanal

No Brasil, o estado de Minas Gerais destaca-se como produtor de queijos artesanais, envolvendo atualmente 9.445 produtores e uma fabricação de mais de 29 mil toneladas de queijos por ano (EMATER, 2017).

Atualmente existem sete regiões reconhecidas como produtoras de QMA: Araxá, Campo das Vertentes, Canastra, Serra do Salitre, Cerrado, Serro e Triângulo Mineiro (IMA, 2017), graças a Lei nº 19.492 promulgada em 2011

(MINAS GERAIS, 2011), que abriu precedentes para o reconhecimento de novas regiões, como aconteceu em 2014 com as regiões do Triângulo Mineiro (Portaria nº 1397) e da Serra do Salitre (Portaria nº 1428).

Na região da Canastra existem mais de 1.500 produtores responsáveis por manufaturar cerca de 5.800 toneladas de queijos por ano (EMATER, 2017). As características ambientais dessa região fornecem condições para o desenvolvimento de um queijo com características sensoriais próprias e de grande popularidade entre os consumidores.

A microrregião da Canastra, caracterizada como região produtora de queijo Minas artesanal pela Portaria nº 694, de 17 de novembro de 2004 é composta pelos municípios de Bambuí, Delfinópolis, Tapiraí, Medeiros, São Roque de Minas, Vargem Bonita e Piumhi (IMA, 2004), conforme ilustrado na Figura 2. Em janeiro de 2017, o IMA reconheceu o município de São João Batista do Glória como produtor de QMA da Serra da Canastra, permitindo que todas as queijarias instaladas nesse município possam se cadastrar ao IMA e comercializar seus queijos com a denominação de QMA da Microrregião da Canastra (IMA, 2017)



Fonte: <http://agriculturaalternativa.com>

Figura 2 – Região produtora de queijo Canastra

O queijo canastra apresenta casca amarelada, o sabor tem um toque picante, potencializado pela maturação prolongada de mais de 20 dias. Embora a grande maioria dos produtores certificados pelo IMA (Instituto Mineiro de Agropecuária) produzam queijos com cerca de 10 dias de maturação para o comércio local, a legislação atual exige maturação mínima de 22 dias para vendas fora do estado de Minas Gerais. Assim, apesar de ser uma exigência sanitária, a legislação resgata um tipo de queijo que era mais comum na época dos tropeiros: mais amarelado e com sabor picante devido à cura estendida por até 60 dias (BONINO, 2014).

1.2. Regulamentação do Queijo Minas Artesanal

Os parâmetros microbiológicos para os QMA são os mesmos que os exigidos para queijos feitos com leite pasteurizado de média umidade (36 a 45,9 %) (BRASIL, 1996).

Em 2000 surgiu a primeira regulamentação sobre os queijos artesanais, a Resolução nº 7 do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) que estabelece a obrigatoriedade de os queijos fabricados com leite cru terem a comercialização liberada e regularizada pelo Serviço de Inspeção Federal (SIF) e a maturação dos queijos por no mínimo 60 dias (BRASIL, 2000). Entretanto, o período de maturação prolongado compromete as características sensoriais e a comercialização dos queijos, fazendo com que essa regulamentação não fosse atendida e aumentando o número de queijos comercializados de forma clandestina.

Em 2002, a Lei Estadual nº 14.185 (MINAS GERAIS, 2002), regulamentou a adequação e certificação das queijarias pelo Instituto Mineiro de Agropecuária (IMA) e definiu aspectos de fabricação, embalagem e transporte dos QMA. Essa regulamentação não foi suficiente para a comercialização interestadual, mas foi considerada um avanço por ter proporcionado um direcionamento sobre os aspectos físicos de produção dos QMA, apesar do período de 60 dias de maturação ter sido mantido (DORES, 2013).

Buscando entender melhor o processo de maturação e fornecer dados suficientes para que um período de maturação mínimo fosse definido, estudos foram realizados pela Universidade Federal de Viçosa (UFV). Os resultados indicaram que 17 dias de maturação para os queijos produzidos na região do

Serro (MARTINS, 2006; MARTINS et al., 2015) e 22 dias para aqueles produzidos pelo processo que utiliza o tecido na prensagem (Canastra e demais regiões) era suficiente para tornar os QMA seguros para consumo (DORES, 2007; DORES et al., 2013). Além disso, verificou-se que *Staphylococcus aureus* foi a espécie patogênica que demorou mais tempo para atingir os limites exigidos pela legislação ($<2,0 \log \text{UFC.g}^{-1}$) (DORES et al., 2013).

Esses estudos subsidiaram o Decreto n° 44.864 de 01 de agosto de 2008, que altera o regulamento da Lei n° 14.185, de 31 de janeiro de 2002, e dispõe sobre o processo de fabricação dos QMA, permitindo a comercialização dos queijos com períodos inferiores a 60 dias de maturação desde que sua inocuidade fosse comprovada. No entanto, o produto poderia circular somente dentro do Estado de Minas Gerais (MINAS GERAIS, 2008), o que não foi o suficiente para que os produtores deixassem de comercializar de forma clandestina para outros estados.

Em 2011, o Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA) publicou a Instrução normativa (IN) nº 57 numa tentativa de diminuir os entraves que excluem a colocação dos QMA no mercado nacional, onde é discutida a possibilidade de redução do período de maturação para menos de 60 dias desde que sua segurança fosse cientificamente comprovada (BRASIL, 2011).

Em 2013, a Portaria nº 1305 do MAPA, aprova 17 dias de maturação para os queijos da microrregião do Serro e 22 dias para as microrregiões da Canastra, Cerrado, Araxá e Campo das Vertentes. Entretanto as queijarias precisam ser integrantes do Sistema Brasileiro de Inspeção de Produtos de Origem Animal (SISBI/POA). A Portaria exige ainda a implementação das boas práticas de ordenha e fabricação (propriedades queijeiras cadastradas), controle de brucelose e tuberculose do rebanho, além de treinamento de boas práticas aos funcionários envolvidos com a produção leiteira (IMA, 2013).

1.3. Microbiota do Queijo Minas Artesanal

A qualidade microbiológica do leite, seja ele pasteurizado ou cru, é fundamental para a fabricação de queijos de boa qualidade. Visando obter matéria-prima de qualidade, os produtores dispõem de ferramentas de qualidade como as Boas Práticas de Fabricação (BPF) para obtenção do leite com

reduzidos níveis de contaminação, diminuindo assim os riscos de incidência de toxinfecções (ZAFFARI et al., 2007).

As BPF são um conjunto de normas empregadas em produtos, processos e edificações que visam à promoção e à certificação da qualidade e segurança do alimento (BRASIL, 1997). Essa ferramenta de qualidade tem sido exigida para queijos artesanais desde o ano de 2002 (MINAS GERAIS, 2002).

Além da matéria-prima e a aplicação das BPF, a microbiota endógena presente no leite e no pingo, a temperatura e o tempo de maturação também são fatores relevantes para as características inerentes aos QMA (DORES, 2013).

Uma das principais características dos QMA é a ausência de uso de fermentos comerciais, fazendo com que o papel de iniciar a fermentação seja desempenhado exclusivamente pela microbiota advinda do ambiente, do leite cru e do fermento endógeno utilizado (pingo). Essa microbiota é representada principalmente por bactérias do ácido láctico (BAL), em especial, pelos gêneros *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc* e *Enterococcus* (LACERDA et al., 2011; DORES; FERREIRA, 2012).

O processo de maturação dos queijos artesanais é obrigatório e permite que a microbiota endógena, especialmente BAL, antagonize e iniba os possíveis patógenos presentes no leite. Dessa forma, ao final deste processo, os QMA encontram-se seguros para o consumo (DORES, 2013).

1.4. Maturação dos queijos

A maturação envolve uma combinação de fatores físicos, químicos e microbiológicos, que são considerados fundamentais para que os queijos alcancem a estabilidade e segurança microbiológica (BERESFORD, 2001; PERRY, 2004; CARDOSO et al., 2015). O processo de maturação é uma exigência para garantir a qualidade de queijos produzidos com leite cru (MARTINS, 2006; DORES, 2013).

Durante a maturação, enzimas proteolíticas e lipolíticas de origem microbiana ou do próprio leite, promovem transformações bioquímicas tanto no interior da massa como na parte periférica dos queijos (MCSWEENEY et al., 2004; PERRY, 2004; MURTAZA et al., 2013; MEI et al., 2014). Nesse período, alguns fatores são importantes para direcionar o desenvolvimento de microrganismos desejáveis e favorecer uma fermentação adequada. Dentre

esses fatores pode-se citar: a temperatura (T), o potencial de oxirredução (Eh), a atividade de água (Aw) e o pH dos queijos. Tais condições devem favorecer o desenvolvimento da microbiota endógena (especialmente BAL) para que possam exercer a atividade antimicrobiana frente a microrganismos deterioradores e patogênicos (FERREIRA, 2004).

Com a fermentação ocorre a produção de ácido láctico e outras substâncias antimicrobianas, além de enzimas bacterianas e fúngicas que são imprescindíveis ao processo de maturação, sendo responsáveis por processos como proteólise e lipólise.

A proteólise, o evento mais importante da maturação, consiste na desestruturação proteica para produtos mais simples e mais solúveis, devido à atuação de várias enzimas, dando origem a numerosos produtos, como peptídeos, cetonas e aminoácidos livres, (GUTIERREZ et al., 2004; SIHUFE et al., 2005). A proteólise atua de forma direta na textura dos queijos promovendo a quebra da rede proteica, redução da atividade de água e formação de novas ligações entre os grupos carboxilas e aminos liberados, além de contribuir para o sabor, por meio da formação de peptídeos e aminoácidos livres (SOUSA et al., 2001).

A lipólise é outro evento que ocorre durante a maturação por ação de enzimas lipolíticas, sendo mais pronunciada em queijos fabricados com leite cru. Os compostos resultantes são ácidos graxos voláteis de cadeia curta, como capróico, caprílico e cáprico, que irão contribuir para o aroma típico dos queijos maturados (FOX, 1993; CABEZAS et al., 2005) e aumentar a sua segurança microbiológica.

1.5. Papel da microbiota do leite na produção de QMA

O leite é uma matriz alimentar rica nutricional e microbiologicamente, sendo encontrados em sua microbiota, microrganismos desejáveis como as bactérias do ácido láctico (BAL), e indesejáveis, como os microrganismos deterioradores e patogênicos (FRANCIOSI et al., 2009).

As bactérias lácticas, primordiais nos QMA, são microrganismos gram-positivos que podem ocorrer na forma de cocos ou bacilos não esporulados, catalase negativos, desprovidos de motilidade e não são patogênicos

(HOLZAPFEL et al., 2001; AXELSSON, 2004). A grande maioria é mesofílica, apesar de algumas linhagens serem termofílicas (LIMA et al., 2009).

As BAL podem ser divididas em bactérias iniciadoras (SLAB) ou não iniciadoras (NSLAB) e estão envolvidas no processo de maturação dos queijos. O primeiro grupo fermenta a lactose com elevada produção de ácido láctico. Nesse grupo inclui: *Lactococcus lactis*, *Leuconostoc* spp., *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus delbrueckii* e *Lactobacillus helveticus* (FOX et al., 2004). Já o grupo NSLAB é um grupo heterogêneo que auxilia o processo de maturação dos queijos, sendo representado por diversas espécies do gênero *Lactobacillus* (GOBBETI et al., 2002; COEURET et al., 2004), *Enterococcus* e *Pediococcus* (CHAMBA; IRLINGER, 2004).

Esse grupo de bactérias desempenha papel importante tanto nos aspectos tecnológicos devido à capacidade de fermentar o açúcar e desenvolver *flavor*, aroma e textura nos produtos, quanto na conservação de alimentos que estão associados à redução de pH como consequência da produção de ácidos orgânicos resultantes da fermentação de açúcares, além da capacidade dessas bactérias produzirem agentes antimicrobianos como as bacteriocinas (RENYE et al., 2011; BALCIUNAS et al., 2013; MONTEL et al., 2014).

Na Serra da Canastra, o pingo utilizado apresenta diversos gêneros de BAL apresentando contagens de aproximadamente 8 log UFC.mL⁻¹. Entretanto, a composição do fermento endógeno é variável, podendo sofrer influência do ambiente, do sistema de ordenha, da época do ano e até mesmo da tecnologia de fabricação dos queijos (BORELLI, 2006).

Bactérias lácticas produzem um grande número de enzimas proteolíticas, glicolíticas e lipolíticas que transformam os nutrientes do leite e do queijo em compostos com propriedades sensoriais desejáveis (LIMA et al., 2009). Esse grupo bacteriano produz também um grande número de antimicrobianos como ácidos orgânicos (KASHKET, 1987; LORCA; VALDEZ, 2009), peróxido de hidrogênio (DAECHEL, 1989; REID, 2008) e bacteriocinas (ROGELJ; BOGOVIČ-MATIJAŠIČ, 1994; COTTER et al., 2005).

Nos queijos, as BAL produzem ácido láctico responsável por acelerar a coagulação do leite auxiliando na sinérese do soro, além de contribuir para o sabor, corpo e textura (AWAD et al., 2007). Entretanto, a principal função atribuída ao ácido produzido por essas bactérias é a antimicrobiana, que ao

acidificar o meio, antagoniza bactérias indesejáveis. O efeito antimicrobiano dos ácidos orgânicos é causado principalmente pela forma não dissociada, que consegue permear a membrana e acidificar o meio intracelular, interferindo nas funções metabólicas essenciais à célula (KASHKET, 1987; LORCA; VALDEZ, 2009).

A produção de bacteriocinas é outra característica comum entre as BAL e de extrema importância para maturação e segurança dos queijos. As bacteriocinas são peptídeos com atividade antimicrobiana que de um modo geral, atuam na membrana celular (ZAPATA et al., 2009), geralmente de espécies ou gêneros relacionados (ROGELJ; BOGOVIČ-MATIJAŠIČ, 1994; COTTER et al., 2005). Esses peptídeos têm a capacidade de inibir microrganismos competidores (MONROY et al., 2009) incluindo patogênicos e formadores de esporos (LEROY; VUYST, 2004) tais como *Listeria monocytogenes* (ZHAO et al., 2004; MINEI et al., 2008; WINKELSTRÖTER et al., 2011), *Bacillus cereus* (ENAN et al., 1996; NOONPAKDEE et al., 2009; HU et al., 2013), *Escherichia coli* (TODOROV et al., 2007), *Clostridium botulinum* (DE VUYST; LEROY, 2007), *Staphylococcus aureus* (FRICOURT et al., 1994; NOONPAKDEE et al., 2009; HU et al., 2013) entre outros.

1.5.1. Segurança dos QMA

Os QMA são produzidos com leite cru, que por se tratar de um excelente meio de cultura carrega uma microbiota diversificada, composta não somente por bactérias desejáveis como bactérias lácticas, mas também por microrganismos que podem oferecer risco à saúde da população (FRAZIER, 1993; CERQUEIRA, 1995; CATÃO, CEBALLOS, 2001). *Salmonella*, *B. cereus*, *Brucella* sp., *E. coli*, *L. monocytogenes*, *Campylobacter* sp. e *S. aureus* são alguns microrganismos relacionados a surtos de toxinfecções alimentares envolvendo o consumo de leite e derivados (SANTOS, 2010).

O consumo de queijo e de alimentos preparados com os mesmos, é responsável por surtos em diversos países, principalmente aqueles produzidos com leite cru, como mostra a Tabela 1.

Tabela 1 –Surtos relacionados ao consumo de queijos em diversos países.

Ano	Tipo de queijo envolvido	Tipo de leite	Patógeno incriminado	Local de ocorrência	Nº de envolvidos	Referências
1987	Minas frescal	*NE	<i>S. aureus</i>	Ouro Preto - MG	4	SABIONI et al., 1988
1994	Minas frescal	Leite cru	<i>S. aureus</i>	Pará de Minas - MG	14	CERQUEIRA et al., 1994
1996	Semicurado	*NE	<i>S. aureus</i>	*NE	7	PEREIRA et al., 1996
1999	Minas frescal	Leite cru	<i>S. aureus</i>	Manhuaçu - MG	50	CARMO et al., 2002
2004	Sanduíche de tomate seco com queijo branco	*NE	<i>Salmonella</i> Typhimurium	São Paulo	28	SILVA et al., 2004
2004	Queijo de cabra fresco	Leite cru	<i>E. coli</i> O157	França	*NE	ESPIÉ et al., 2006
2006	Queijo macio	Leite cru	<i>Salmonella</i> Montevideo	França	*NE	DOMINGUEZ et al., 2009
2006	Queijo duro feito (“Queijo de fazenda”)	Leite cru	<i>Salmonella</i> Typhimurium	Holanda	200	VAN DUYNHOVEN et al., 2009
2008	Queijo de leite de cabra	Leite cru	<i>Salmonella</i> Muenster	França	*NE	VAN CAUTEREN et al., 2009
2009-2010	Queijo Quargel	*NE	<i>L. monocytogenes</i>	Áustria, Alemanha e República Checa	34	PICHLER et al., 2011
2014	Queijo Tomme	Leite cru	<i>S. aureus</i>	Suíça	14	JOHLER et al., 2015

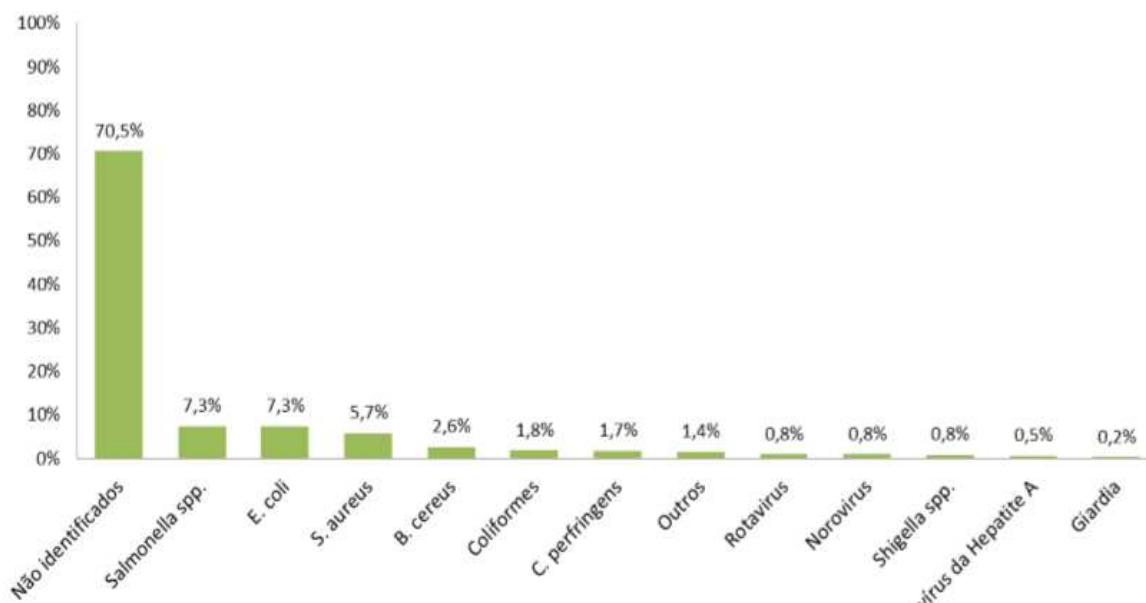
*NE – Não especificado

Staphylococcus aureus é um dos patógenos mais envolvidos em surtos associado ao consumo de queijos. Essa espécie é capaz de produzir uma toxina termoresistente (SILVA et al., 2007), e é a espécie microbiana responsável por definir o período mínimo de maturação dos QMA, uma vez que estudos realizados por Martins (2006) e Dore (2007) mostraram ser esse o patógeno mais resistente, permanecendo viável por mais tempo até atingir níveis estabelecidos pela legislação ($2,0 \log \text{UFC.g}^{-1}$) (MINAS GERAIS, 2008).

Alguns estudos microbiológicos encontraram concentrações de *S. aureus* em queijos artesanais acima daquelas permitidas pela legislação em Araxá (ARAÚJO et al, 2005; SOUZA et al., 2015), Serro (BRANT et al., 2007; SANTOS 2010) e Canastra (BORELLI et al., 2006; DORES et al., 2013b), e ainda assim atualmente não há relatos de notificações de toxinfecções estafilocócicas relacionadas ao seu consumo, sendo mais comum surtos na década de 90, envolvendo queijos Minas Frescal feitos com leite cru (SABIONI et al., 1988; CERQUEIRA et al., 1994; PEREIRA et al., 1996, CARMO et al., 2002).

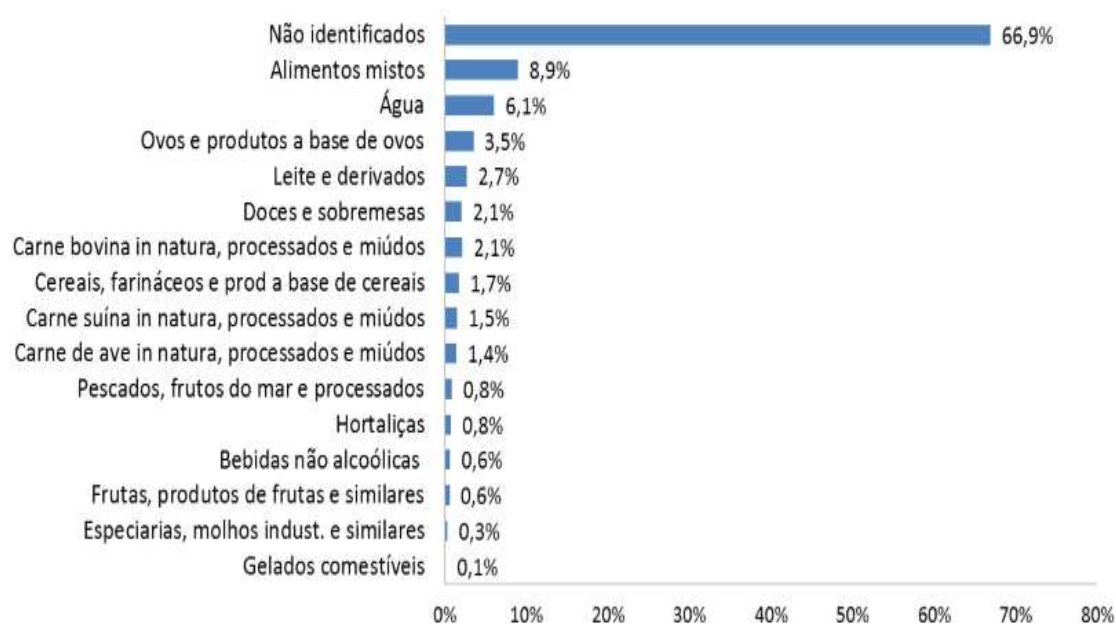
No Estado de Minas Gerais, no ano de 1991 e 1992 ocorreram oito surtos de intoxicação estafilocócica em humanos sendo cinco associados ao consumo de queijo frescal (CÂMARA, 2002). No período de 1997 a 2002, foram notificados 18 surtos que tiveram como alimentos implicados o leite e produtos lácteos. Os alimentos foram analisados e constatou-se que os principais agentes envolvidos foram *S. aureus* e *Staphylococcus* coagulase negativa enterotoxigênicos, sendo o queijo o principal responsável pelos surtos, porém não especifica se esses queijos eram ou não maturados (VERAS et al., 2003).

No Brasil, no período de 2007 a 2016 ocorreram 111 óbitos em decorrência de 6.848 surtos de intoxicação alimentar. *S. aureus* foi um dos principais microrganismos envolvidos (5,7%), perdendo somente para *E. coli* (7,3%) e *Salmonella* spp (7,3%) (Figura 3). Do total de surtos ocorridos nesse intervalo, somente 2.267 tiveram o alimento responsável por veicular o patógeno identificado, sendo que mais de 180 surtos, ou seja, 7,9% tiveram o leite e seus derivados como veículo (Figura 4). Apesar de ser um valor relativamente baixo, os produtos lácteos foram o quarto alimento mais comumente envolvido (SINAN/SVS, 2016), além disso, não há descrição de quantos desses surtos está associado ao consumo de queijos.



Fonte: Sinan Net/SVS/MS. *Dados sujeitos à alteração

Figura 3 – Percentual de surtos ocorridos no Brasil de 2007 a 2016* por patógeno.



Fonte: Sinan Net/SVS/MS. *Dados sujeitos à alteração

Figura 4 – Percentual de surtos ocorridos no Brasil de 2007 a 2016* por alimento envolvido.

Vale ressaltar que grande parte dos surtos envolvendo alimentos muitas vezes não é notificada, em alguns casos não há identificação dos alimentos envolvidos e em outros não são identificados os agentes etiológicos envolvidos, fazendo com que esses dados sejam subestimados ou imprecisos.

1.5.2. *Staphylococcus* spp.

O gênero *Staphylococcus* encontra-se amplamente distribuído na natureza e segundo Euzéby (2017) inclui 52 espécies e 28 subespécies, divididos em coagulase positiva e coagulase negativa.

As espécies estafilocócicas coagulase negativas (SCN) podem ser encontradas em diversos alimentos fermentados, como os queijos tradicionais (ERCOLINI et al., 2003; MOUNIER et al., 2005) e produtos cárneos (MARTÍN et al., 2006). Esses microrganismos são tolerantes ao ácido e ao sal e podem contribuir para o desenvolvimento de flavor e aroma para os produtos fermentados pela ação de enzimas lipolíticas e proteolíticas extracelulares (AQUILANTI et al., 2007).

Embora SCN geralmente sejam considerados como tendo papel positivo na produção de alimentos fermentados (IRLINGER, 2008), algumas espécies deste grupo podem apresentar fatores de virulência como a produção de enterotoxina (VERNOZY-ROZAND et al., 1996; ZELL et al., 2008), resistência a antibióticos (MCKAY, 2008; RESCH et al., 2008) e capacidade de produzir aminas biogênicas (MARTUSCELLI et al., 2000; MARTÍN et al., 2006) o que requer cuidado quando trata-se de estirpes relacionadas a alimentos, apesar de não haver relatos de casos envolvendo SCN em intoxicação alimentar após a ingestão de produtos lácteos ou cárneos (IRLINGER, 2008; COTON et al., 2010).

Dentre as espécies pertencentes ao gênero *Staphylococcus*, há aqueles capazes de produzirem a coagulase, uma enzima capaz de coagular o plasma sanguíneo de humanos e algumas espécies de animais, embora em graus diferentes. A principal espécie de *Staphylococcus* coagulase positiva (SCP), *Staphylococcus aureus*, é um patógeno comumente envolvido em intoxicações alimentares (DE BUYSER et al., 2001; SPANU et al., 2012), envolvendo o consumo de diversos tipos de alimentos, como: produtos à base de ovos e carnes, saladas com molhos, produtos de confeitarias, sanduíches, leite e derivados (FRANCO; LANDGRAF, 2008).

S. aureus é uma espécie anaeróbia facultativa, ubíqua, coco, gram-positiva, com conformação em cachos. É um agente patogênico oportunista comum (KLUYTMANS et al., 1997; PINCHUK et al., 2010) que expressa uma grande variedade de fatores de virulência. Desses, os principais são as

enterotoxinas estafilocócicas (SE) (CZOP, BERGDOLL, 1974; DERZELLE et al., 2009) e a Toxina-1 da síndrome do choque tóxico (TSST) (BERGDOLL et al., 1981; REISER et al., 1983).

Por ser um dos principais agentes etiológicos causadores da mastite em gado de leite (WILSON et al., 1997), é comum encontrar *S. aureus* contaminando o leite cru, o que pode constituir um perigo bacteriológico para a segurança dos consumidores (BERGONIER et al., 2014).

Além disso, alimentos muito manipulados durante o preparo e que são mantidos à temperatura ambiente, geralmente são os maiores causadores da intoxicação estafilocócica (JAY, 2005). O *habitat* natural do *S. aureus* é a pele e as fossas nasais dos humanos e dos animais, o que torna indispensável a aplicação das Boas Práticas de Fabricação, principalmente no aspecto de higiene dos manipuladores, como forma de evitar casos e surtos de intoxicações causadas por esse patógeno (SANTANA et al., 2010).

A transferência horizontal de virulência é um evento comum entre linhagens de *S. aureus* devido ao fato da maioria dos genes que codificam as SE estarem localizadas em elementos móveis, como plasmídeos (ONO et al., 2008; ZHANG et al., 1998), bacteriófagos (GOERKE et al., 2009) ou ilhas de patogenicidade (LINDSAY et al., 1998; TALLENT et al., 2007).

As SE são um grupo de proteínas extracelulares sorologicamente distintas e termoestáveis expressas por *S. aureus* (PINCHUK et al., 2010). Existem mais de 20 SE distintas (A a V), sendo SEA, SEB, SEC e SED as mais envolvidas em intoxicação de origem alimentar, embora alguns casos envolvendo outras SE já tenham sido reportados (LER et al., 2006; PINCHUK et al., 2010). Outra toxina expressa por esse patógeno é a toxina do choque tóxico (TSST-1), potencialmente fatal caracterizada por febre alta, descamação da pele, eritemas difusos, hipotensão e alterações em diversos órgãos (DINGES et al., 2000). A TSST-1 tem se destacado nos últimos anos por ter sido detectada com certa frequência nos casos de mastite bovina em gado de leite (NADER FILHO et al., 2007), embora a manifestação clínica no homem não esteja associada ao consumo de alimentos.

Para que as SE causem intoxicação, é necessário ingerir alimento contendo a toxina estafilocócica pré-formada, entretanto, não se sabe a dose da toxina necessária para causar os sintomas no ser humano (DORES, 2013). Os

sintomas incluem náuseas, vômitos, dor abdominal, cólicas e diarreia, podendo aparecer logo após a ingestão do alimento contaminado ou horas depois (ATANASSOVA et al., 2001; PINCHUK et al., 2010).

Em QMA, a presença de *S. aureus* é preocupante, por ser o patógeno que permanece mais tempo em contagens acima do permitido por lei ($2 \log$ de UFC.g⁻¹) (MINAS GERAIS, 2008), durante o período de maturação. Embora diversos estudos tenham encontrado contagens desse patógeno acima de $2 \log$ UFC.g⁻¹ (ARAÚJO et al., 2005; SOUZA et al., 2015; BRANT et al., 2007; SANTOS, 2010; BORELLI et al., 2006; DORES et al., 2013b) não há relatos de notificações de surtos causados pelo consumo de QMA contaminados com *S. aureus*. Essa ausência de notificações possivelmente está relacionada ao fato das cepas presentes nesse tipo de alimento não apresentarem em seu genoma os genes responsáveis por codificar as enterotoxinas ou devido ao mecanismo de defesa dessas bactérias à redução de pH. Com a fermentação ocorre a liberação de ácidos orgânicos pelas BAL presentes no leite e no pingo, que promove a redução do pH, sendo essa uma condição estressante ao *S. aureus*, que sintetiza proteínas de superfície como forma de defesa (NOUT, 1994; NOVICK, GEISINGER, 2008). Porém acredita-se que esse mecanismo de defesa seja regulado pelos mesmos genes relacionados à expressão de enterotoxinas, fazendo com que mesmo que a cepa apresente o gene produtor, esses genes podem estar silenciados (ARAÚJO, 2013).

Considerando a relevância da atividade queijeira para as famílias que produzem QMA na região da Serra da Canastra e o grande número de consumidor, é importante conhecer as condições de produção e comercialização desses queijos, bem como o papel do fermento endógeno utilizado e, principalmente, a influência de sua microbiota na qualidade microbiológica e segurança desses queijos artesanais. O conhecimento cada vez mais aprofundado em relação a tudo que envolve a produção de QMA pode contribuir para uma maior notoriedade e uma valorização crescente desses queijos, além de reforçar para as autoridades importância da atividade para economia de das famílias envolvidas, a fim de que sejam lançadas mais políticas públicas que incentivem a produção de QMA, para que essa tradição secular nunca deixe de existir.

2. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AQUILANTI, L.; SANTARELLI, S.; SILVESTRI, G.; OSIMANI, A.; PETRUZZELLI, A.; CLEMENTI, F. The microbial ecology of a typical Italian salami during its natural fermentation. **International Journal of Food Microbiology**, 120, pp. 136–145, 2007.
- ARAÚJO, R. A. B. et al. Avaliação de *Staphylococcus aureus* em queijo Minas artesanal produzido na região de Araxá. In: ENCONTRO NACIONAL DE ANALISTAS DE ALIMENTOS, 14, Goiânia – GO, 2005. **Anais**. Goiânia, 2005.
- ARAÚJO, T. F. **Potencial de aminos bioativas como indicadoras do estágio de maturação e o papel da microbiota endógena do leite cru na inocuidade e características do queijo artesanal**. 113 f. 2013. Tese (Doutorado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Universidade Federal de Viçosa.
- ATANASSOVA, V., MEINDL, A., & RING, C. Prevalence of *Staphylococcus aureus* and staphylococcal enterotoxins in raw pork and uncooked smoked ham - a comparison of classical culturing detection and RFLP-PCR. **International Journal of Food Microbiology** 68:105-113, 2001.
- AWAD, S.; AHME, N.; SODA, M. Evaluation of isolated starter lactic acid bacteria in Ras cheese ripening and flavor development. **Food Chemistry**. 104: 1192-1199; 2007.
- AXELSSON, L. Lactic acid bacteria: classification and physiology. In: SALMINEN, S.; LAHTINEN, S.; OUWEHAND A.C.; WRIGHT A.V. **Lactic acid bacteria: microbiology and functional aspects**. New York: Marcel Decker, 30, 2004.
- BALCIUNAS, E. M.; MARTINEZ, F. A. C.; TODOROV, S. V.; FRANCO, B. D. G. M.; CONVERTI, A.; OLIVEIRA, R. P. S. Novel biotechnological applications of bacteriocins: a review. **Food Control**. 32 (1): 134-142, 2013.
- BERESFORD, T.P.; FITZSIMONS, N.A.; BRENNAN, N.L. et al. Recent advances in cheese microbiology. **International Dairy Journal**. 11: 259-274, 2001.
- BERGDOLL, M. S.; CRASS, B. A.; REISER, R. F.; ROBBINS, R. N.; DAVIS, J. P. A new Staphylococcal enterotoxin, enterotoxin F, associated with toxic-shock-syndrome *Staphylococcus aureus* isolates. **Lancet**; 5:1017–1021, 1981.
- BERGONIER, D.; SOBRAL, D.; FEBLER, A.T.; JACQUET, E.; GILBERT, F.B.; SCHWARZ, S.; TREILLES, M.; BOULOC, P.; POURCEL, C.; VERGNAUD, G. *Staphylococcus aureus* from 152 cases of bovine, ovine and caprine mastitis investigated by Multiple-locus variable number of tandem repeat analysis (MLVA). **Veterinary Research**, 45(1): 97, 2014.
- BONINO, R. Queijo da Serra da Canastra. 2014. Disponível em: <http://asacolabrasileira.com.br/2014/09/05/queijo-da-serra-da-canastra/#.VMe5KGjF-H4>. Acessado em: 7 de janeiro de 2015.
- BORELLI, B. M. Enterotoxigenic *Staphylococcus* spp. and other microbial contaminants during production of Canastra cheese, Brazil. **Brazilian journal of Microbiology**, 37: 545-550, 2006.

BRANT, L. M. F.; FONSECA, L. M.; SILVA, M. C. C. Avaliação da qualidade microbiológica do queijo-de-minas artesanal do Serro-MG. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 59, n. 6, p. 1570-1574, 2007.

BRASIL, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Portaria 146 de 7 de março de 1996: **Aprova os regulamentos técnicos de identidade e qualidade dos queijos**. Diário Oficial da União, Brasília, seção 1, 1996. p.3977. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br>>. Acesso em: 10 jun. 2014.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento Resolução nº 7 de 28 de novembro 2000. **Estabelece critérios de funcionamento e de controle da produção de queijarias, para seu relacionamento junto ao Serviço de Inspeção Federal**. 2000.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº57 de 15 de dezembro de 2011. **Estabelece critérios adicionais para elaboração de queijos artesanais**. Diário Oficial da União, Brasília, Seção 1, p.23, 2011.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Portaria nº 368 de 4 de setembro de 1997. **Regulamento técnico sobre as condições higiênico-sanitárias e de boas práticas de fabricação para estabelecimentos elaboradores/industrializadores de alimentos**. 1997.

CABEZAS, L.; POVEDA, J. M.; SÁNCHEZ, M. I.; PALOP, M. L. L. Physicochemical and sensory characteristics of Spanish goat cheeses. **Milchwissenschaft**. 60: 48-55, 2005.

CÂMARA, S. A. V. **Surtos de toxinfecções alimentares no Estado de Mato Grosso do Sul no período de 1998-2001**. [Monografia]. Campo Grande (MS): Universidade Federal de Campo Grande; 2002.

CARDOSO, V. M.; BORELLI, B. M.; LARA, C.A.; SOARES, M. A.; PATARO, C.; BODEVAN, E. C.; ROSA, C. A. The influence of seasons and ripening time on yeast communities of a traditional Brazilian cheese. **Food Research International**. 69: 331-340, 2015.

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

CATÃO, R. M. R.; CEBALLOS, B. S. O. *Listeria* spp., coliformes totais e fecais e *E. coli* no leite cru e pasteurizado de uma indústria de laticínios, no estado da paraíba (Brasil). **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, 21(3): 281-287, 2001.

CERQUEIRA, M. M. O. P. & LEITE, M. O. Doenças Transmissíveis pelo Leite e Derivados. **Caderno Técnico da Escola de Veterinária da UFMG**, 13: 39-62, 1995.

SILVA, C. C.; RODRIGUES, M. M.; MARTINS, B. R.; EDUARDO, M. B. P.; BASSIT, N.P.; CÉSAR, M. L. V. S.; KATO, M. A. M.; FERNANDES, S. A.; THIAGO, C.; PIMENTEL, E.P.; PAVANELLI, E. I.; COLLEONE, R. P.; VIGILATO, M. A. N.; RANDI, A.P. Toxinfecção alimentar por *Salmonella* em São Paulo-SP., setembro de 2004. **Boletim Epidemiológico Paulista**, São Paulo, v. 1, n.11, p. 1-8, 2004.

CERQUEIRA, M.M.O.P.; SOUZA, M.R.; FONSECA, L.M.; RODRIGUES, R.; RUBINICH, J. Surto epidêmico de toxinfecção alimentar envolvendo queijo tipo Minas Frescal em Pará de Minas. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 46, p. 723-8, 1994.

CHAMBA, J. F.; IRLINGER, F. Secondary and adjunct cultures. In: FOX, P.F.; MCSWEENEY, P.L.H.; COGAN, T.M.; GUINEE, T.P. (Eds.), **Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology**, Elsevier, London, UK, 191–206, 2004.

COEURET, V.; GUEGUEN, M.; VERNOUX, J.P. In vitro screening of potential probiotic activities of selected lactobacilli isolated from unpasteurized milk products for incorporation into soft cheese. **Journal of Dairy Research**. 71: 451-460, 2004.

COTON, E.; DESMONTS, M. H.; LEROY, S.; COTON, M.; JAMET, E.; CHRISTIEANS, S.; DONNIO, P.Y.; LEBERT, I. TALON, R. Biodiversity of coagulase-negative staphylococci in French cheeses, dry fermented sausages, processing environments and clinical samples. **International Journal of Food Microbiology**, 137, pp. 221–229, 2010.

COTTER, P.D.; HILL, C.; ROSS, R. P. Bacteriocins: Developing innate immunity for food. **Nature Reviews Microbiology**. 3: 777-788, 2005.

CZOP, J. K.; BERGDOLL, M. S. *Staphylococcal* enterotoxin synthesis during the exponential, transitional, and stationary growth phases. **Infection and Immunity**. 9:229–235, 1974.

DAECHEL, M. A. Antimicrobial substances from lactic acid bacteria for use as food preservatives. **Food Technology**. 43: 164-167, 1989.

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

DE VUYST, L.; LEROY, F. Bacteriocins from lactic acid bacteria: Production, purification and food applications. **Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology**. 13: 194-199, 2007.

DERZELLE, S.; DILASSER, F.; DUQUENNE, M.; DEPERROIS, V. Differential temporal expression of the *staphylococcal* enterotoxin genes during cell growth. **Food Microbiology**. 26:896–904, 2009.

DOMINGUEZ, M.; JOURDAN-DA SILVA, N.; VAILLANT, V.; PIHIER, N.; KERMIN, C.; WEILL, F.X. et al. Outbreak of *Salmonella* enterica serotype Montevideo infections in France linked to consumption of cheese made from raw milk. **Foodborne Pathogens and Disease**, 6: 121–128, 2009.

DORES, M. T. **Enterotoxigenicidade de *Staphylococcus aureus* isolados de queijo Minas artesanal da canastra**. Viçosa: UFV, 2013. 78p. Tese de doutorado em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal de Viçosa, 2013.

DORES, M. T. **Implicações do Processo de maturação à temperatura ambiente e sob refrigeração do queijo Minas artesanal da Canastra produzido na região de Medeiros, Minas Gerais**. 101 p., 2007. Dissertação de

Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal de Viçosa.

DORES, M. T.; FERREIRA, C. L. L. F. Queijo Minas artesanal, tradição centenária: Ameaças e desafios. **Revista Brasileira de Agropecuária Sustentável (RBAS)**. 2(2): 26-34, 2012.

DORES, M. T.; NOBREGA, J. E.; FERREIRA, C. L. L. F. Ripening at room temperature warrants microbiological safety in the Brazilian Artisan Canastra Cheese. **Ciência e Tecnologia de Alimentos** (Impresso). 33: 180-185, 2013.

DORES, M. T.; NOBREGA, J. E.; FERREIRA, C. L. L. F. Room temperature aging to guarantee microbiological safety of Brazilian artisan canastra cheese. **Revista Ciência e Tecnologia de Alimentos**. 33(1): 180-185, 2013b.

Empresa de Assistência Técnica e Extensão Rural do Estado de Minas Gerais - EMATER-MG. **Ações Extencionistas para o Desenvolvimento Rural Sustentável**. Revista EMATER – MG, ano XXII, n.77, p. 16-17, 2003.

Empresa de Assistência Técnica e Extensão Rural do Estado de Minas Gerais / EMATER-MG. **Mapa do Queijo Minas Artesanal**. 2015. Disponível em: http://www.emater.mg.gov.br/portal.cgi?flagweb=site_pgn_downloads_vert&grupo=135&menu=59. Acesso em 15 maio de 2017.

ENAN, G.; ESSAWY, A. A.; UYTENDAELE, M.; DEBEVERE, J. Antibacterial activity of *Lactobacillus plantarum* UG1 isolated from dry sausage: Characterization, production and bactericidal action of plantaricin UG1. **International Journal of Food Microbiology**, 30: 189–215, 1996.

ERCOLINI, D.; HILL, P. J.; DODD, C. E. Bacterial community structure and location in Stilton cheese. **Applied and Environmental Microbiology**, 69: 3540–3548, 2003.

ESPIÉ, E.; VAILLANT, V.; MARIANI-KURKDJIAN, P.; GRIMONT, F.; MARTIN-SCHALLER, R.; DE VALK, H. et al. Escherichia coli O157 outbreak associated with fresh unpasteurized goats' cheese. **Epidemiology and Infection**, 134: 143–146, 2006.

EUZÉBY, J.P. List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature. Genus *Staphylococcus*. Disponível em: <http://www.bacterio.net/staphylococcus.html>. Acessado em: 01 de maio de 2017.

FERREIRA, C. L. L. F. Fatores que afetam o crescimento de microrganismos em queijo. **Revista Leite e Derivados**, ano XIII, 76: 91-96. 2004.

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

FOX, P. F.; MCSWEENEY, P. L. H.; COGAN, T. M.; GUINEE, T. P. (Eds.), **Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology**, Elsevier, London, UK, 2004.

FRANCIOSI, E; SETTENNI, L.; CAVAZZA, A.; POZNASKI, E. Biodiversity and technological potencial of wild lactic acid bacteria from raw cows' milk. **International Dairy Journal**. 19: 3-11, 2009.

FRANCO, B. D. G. M. F.; LANDGRAF, M. **Microbiologia dos alimentos**. São Paulo: Atheneu, 182 p., 2008.

FRAZIER, W. C. **Microbiologia de los alimentos**. Acribia, 4ªed. Zaragoza, España, 681p., 1993.

FRICOURT, B.V.; BAREFOOT, S.F.; TESTIN, R.F.; HAYASAKA, S.S. Detection and activity of plantaricin F an antibacterial substance from *Lactobacillus plantarum* BF001 isolated from processed channel catfish. **Journal of Food Protection**, 57: 698–702, 1994.

GOBBETTI, M.; MOREA, M.; BARUZZI, F.; CORBO, M. R.; MATARANTE, A.; CONSIDINE, T.; DI CAGNO, R.; GUINEE, T.; FOX, P. F. Microbiological, compositional, biochemical and textural characterisation of Caciocavallo Pugliese cheese during ripening. **International Dairy Journal**. 12: 511–523, 2002.

GOERKE, C.; PANTUCEK, R.; SILVA HOLTFRETER, S.; BERIT SCHULTE, B.; MANUEL ZINK, M.; GRUMANN, D.; BRÖKER, B. M.; DOSKAR, J.; WOLZ, C. Diversity of prophages in dominant *Staphylococcus aureus* clonal lineages. **Journal of Bacteriology**. 191:3462–3468, 2009.

GUTIERREZ, E. M. R.; DOMARCO, R. E.; SPOTO, M. H. F.; BLUMER, L.; MATRAIA, C. Efeito da radiação gama nas características físico-químicas e microbiológicas do queijo prato durante a maturação. **Revista Ciência e Tecnologia de Alimentos**. 24(4): 596-601, 2004.

HOLZAPFEL, W. H.; HABERER, R.; GEISEN, J.; BJÖRKROTH, U.; SCHILLINGER, P. Taxonomy and important features of probiotic microorganisms in food nutrition. **American Journal of Clinical Nutrition**. 73: 365S-373S, 2001.

HU, M.; ZHAO, H.; ZHANG, C.; YU, J.; LU, Z. Purification and characterization of plantaricin 163, a novel bacteriocin produced by *Lactobacillus plantarum* 163 isolated from traditional Chinese fermented vegetables. **Journal of agricultural and food chemistry**, 61: 11676–11682, 2013.

INSTITUTO DO PATRIMÔNIO HISTÓRICO E ARTÍSTICO NACIONAL – IPHAN. Ministério da Cultura. Serviço Público Federal. **Certidão do Registro do modo artesanal de fazer queijo de Minas, nas Regiões do Serro e nas Serras da Canastra e do Salitre**. Data do Registro: 13 jun. 2008. Brasília: Departamento do Patrimônio Imaterial do Instituto do Patrimônio Histórico e Artístico Nacional, 2 p., 2008.

INSTITUTO MINEIRO DE AGROPECUÁRIA - IMA. Portaria nº 1305, de 30 de abril de 2013. **Estabelece diretrizes para a produção do queijo Minas artesanal**. 2013.

INSTITUTO MINEIRO DE AGROPECUÁRIA - IMA. Portaria nº 1397 de 13 de fevereiro de 2014. **Identifica a Região do Triângulo Mineiro como produtora de Queijo Minas Artesanal**. 2014. Disponível em:<[http:// www.ima.mg.gov.br/](http://www.ima.mg.gov.br/)>. Acessado em 30 de julho de 2014.

INSTITUTO MINEIRO DE AGROPECUÁRIA - IMA. Portaria nº 1428 de 29 de agosto de 2014. **Identifica a Região da Serra do Salitre como produtora de Queijo Minas Artesanal**. 2014. Disponível em:<[http:// www.ima.mg.gov.br/](http://www.ima.mg.gov.br/)>. Acessado em 30 de julho de 2014

INSTITUTO MINEIRO DE AGROPECUÁRIA - IMA. 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.

INSTITUTO MINEIRO DE AGROPECUÁRIA – IMA. Portaria nº 694, de 17 de novembro de 2004. **Identifica a microrregião da canastra como produtora de queijo Minas artesanal.** 2004.

INSTITUTO MINEIRO DE AGROPECUÁRIA. IMA. **IMA reconhece São João Batista do Glória como produtor de Queijo Minas Artesanal.** Disponível em: <http://www.ima.mg.gov.br/acontece-no-ima/2039-ima-reconhece-sao-joao-batista-do-gloria-como-produtor-de-queijo-minas-artesanal>. Acessado em: 21 de abril de 2017.

IRLINGER, F. Safety assessment of dairy microorganisms: coagulase-negative staphylococci. **International Journal of Food Microbiology**, 126: 302–310, 2008.

JAY, J. M. **Microbiologia de Alimentos**. 6 ed. Porto Alegre, Artmídia, 715p. 2005.

JOHLER, S.; WEDER, D.; BRIDY, C.; HUGUENIN, M.C.; ROBERT, L.; HUMMERJOHANN, J.; STEPHAN, R. Outbreak of staphylococcal food poisoning among children and staff at a Swiss boarding school due to soft cheese made from raw milk. **Journal of Dairy Science**, 98(5): 2944–2948, 2015.

KASHKET, E. R. Bioenergetics of lactic acid bacteria: Cytoplasmic pH and osmotolerance, **FEMS Microbiology Reviews**. 46: 233–244, 1987.

KLUYTMANS, J.; VAN BELKUM, A.; VERBRUGH, H. Nasal Carriage of *Staphylococcus aureus*: Epidemiology, Underlying Mechanisms, and Associated Risks. **Clinical Microbiology Reviews**, 10, 505–520, 1997.

LACERDA, I. C.; GOMES, F. C.; BORELLI, B. M.; FARIA, C. L. JR.; FRANCO, G. R.; MOURÃO, M. M.; MORAIS, P. B.; ROSA, C. A. Identification of the bacterial community responsible for traditional fermentation during sour cassava starch, cachaça and Minas cheese production using culture independent 16S rRNA gene sequence analysis. **Brazilian Journal of Microbiology**, 42: 650–657, 2011.

LANCIOTTI, R.; PATRIGNANI, F.; BAGNOLINI, F.; GUERZONI, M.E.; GARDINI, F. Evaluation of diacetyl antimicrobial activity against *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes* and *Staphylococcus aureus*. **Food Microbiology**, v. 20, n. 5, p. 537–543, 2003.

LER, S.G.; LEE, F.K.; GOPALAKRISHNAKONE, P. Trends in Detection of Warfare Agents. Detection Methods for Ricin, Staphylococcal Enterotoxin B and T-2 Toxin. **Journal of Chromatography A**, 1133, 1–12, 2006.

LEROY, F.; DE VUYST, L. Lactic acid bacteria as functional starter cultures for the food fermentation industry. **Trends in Food Science and Technology**. 15(2): 67-78, 2004.

LIMA, C.; LIMA, L.; CERQUEIRA, M.; FERREIRA, E.; ROSA, C. Bactérias do ácido láctico e leveduras associadas com o queijo-de-minas artesanal produzido na região da Serra do Salitre, Minas Gerais. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**. 61(1): 266-272, 2009.

- LINDSAY, J. A.; RUZIN, A.; ROSS, H. F.; KUREPINA, N.; NOVICK, R. P. The gene for toxic shock toxin is carried by a family of mobile pathogenicity islands in *Staphylococcus aureus*. **Molecular Microbiology**, Oxford, v. 29, p. 527-543, 1998.
- DINGES, M. M.; ORWIN, P. M.; SCHLIEVERT, P. M. Exotoxins of *Staphylococcus aureus*. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 13, p. 16-34, 2000.
- LORCA, G. L.; DE VALDEZ, G. F. *Lactobacillus* Stress Responses. In: *Lactobacillus* Molecular Biology: From Genomics to Probiotics, LJUNGH, Å.; WADSTRÖM, T. (Eds.), **Caister Academic Press**, Norfolk, UK, p. 115–138, 2009.
- MARTIN, B., GARRIGA, M., HUGAS, M., BOVER-CID, S., VECIANA-NOGUÉS, M. T., AYMERICH, T. Molecular, technological and safety characterization of Gram-positive catalase positive cocci from slightly fermented sausages. **International Journal of Food Microbiology**, 107, 148-158, 2006.
- MARTINS, J. M. **Características físico-químicas e microbiológicas durante a maturação do queijo Minas artesanal da Região do Serro**. 2006. 158 f. Tese (Doutorado em Ciência e Tecnologia de Alimentos). Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2006.
- MARTINS, J. M. **Características físico-químicas e microbiológicas durante a maturação do queijo Minas artesanal da Região do Serro**. 2006. 158 f. Tese (Doutorado em Ciência e Tecnologia de Alimentos). Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2006.
- MARTINS, J. M.; GALINARI, E.; PIMENTEL-FILHO, N. J.; RIBEIRO JR, J. I.; FURTADO, M. M.; FERREIRA, C.L.L.F. Determining the minimum ripening time of artisanal Minas cheese, a traditional Brazilian cheese. **Brazilian Journal of Microbiology** (Online). 46: 219-230, 2015.
- MARTUSCELLI, M.; CRUDELE, M.A.; GARDINI, F.; SUZZI, G. Biogenic amine formation and oxidation by *Staphylococcus xylosus* strains from artisanal fermented sausages. **Letters in Applied Microbiology**, 31: 228–232, 2000.
- MCSWEENEY, P. L. H.; OTTOGALLI, G.; FOX, P. F. Diversity of cheese varieties: an overview. In: FOX, P. F. (Eds.). **Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology**. **Academic Press**. 2: 1-23, 2004.
- MEI, J.; GUO, Q.; WU, Y.; LI, Y. Microbial Diversity of a Camembert-Type Cheese Using Freeze-Dried Tibetan Kefir Coculture as Starter Culture by Culture-Dependent and Culture-Independent Methods. **PLoS ONE** 9(10): e111648, 2014.
- MINAS GERAIS. Assembleia Legislativa do Estado de Minas Gerais. Decreto nº 44.864 de 01 de agosto de 2008. **Altera o regulamento da lei nº14.185 de 31 de janeiro de 2002, que dispõe sobre o processo de produção do queijo Minas artesanal**. Belo Horizonte: Assembléia Legislativa do Estado de Minas Gerais, 2008.
- MINAS GERAIS. Assembleia Legislativa do Estado de Minas Gerais. Lei nº 19.492, de 13 de janeiro de 2011. **Altera dispositivos da Lei nº14.185, de 31 de janeiro de 2002, que dispõe sobre o processo de produção do Queijo Minas Artesanal e dá outras providências**. Belo Horizonte: Assembleia Legislativa do Estado de Minas Gerais, 2011.

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

MINEI, C.C.; GOMES, B.C.; RATTI, R.P.; D'ANGELIS, C.E.M.; DE MARTINIS, E.C.P. Influence of peroxyacetic acid and nisin and coculture with *Enterococcus faecium* on *Listeria monocytogenes* biofilm formation. **Journal of Food Protection**. 71: 634–638, 2008.

MONROY, D. M.; CASTRO, B. T.; FERNÁNDEZ, P. F.; MOYORGA, R. L. Revisión bibliográfica: Bacteriocinas producidas por bacterias probióticas. **Contactos**, 73: 63-72, 2009.

MONTEL, M. C.; BUCHIN, S.; MALLET, A.; PAUS-DELBES, C.; VUITTON, D. A.; DESMASURES, N.; BERTHIRES, F. Traditional cheeses: Rich and diverse microbiota with associated benefits, **International Journal of Food Microbiology**. 177: 136- 154, 2014.

MOUNIER, J.; GELSOMINO, R.; GOERGES, S.; VANCANNEYT, M.; VANDEMEULEBROECKE, K.; HOSTE, B.; SCHERER, S.; SWINGS, J.; FITZGERALD, G. F.; COGAN, T. M. Surface microflora of four smear-ripened cheeses. **Applied and Environmental Microbiology**, 71: 6489–6500, 2005.

MURTAZA, M. A.; UR-REHMAN, S.; ANJUM, F. M.; HUMA, N.; HAFIZ, I. Cheddar cheese ripening and flavor characterization: a review. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**. 54: 1309–1321, 2013.

NADER FILHO, A.; FERREIRA, L. M.; AMARAL, L. A.; ROSSI JUNIOR, O.D.; OLIVEIRA, R. P. Sensibilidade antimicrobiana dos *Staphylococcus aureus* isolados no leite de vacas com mastite. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 74, n. 1, p. 1-4, 2007.

NOGUEIRA, M. C. L.; LUBACHEVSKY, G.; RANKIN, S. A. A study of the volatile composition of Minas cheese. **Food Science and Technology**. 38: 555–563, 2005.

NOONPAKDEE, W.; JUMRIANGRIT, P.; WITTAYAKOM, K.; ZENDO, J.; NAKAYAMA, J.; SONOMOTO, K. et al. Two-peptide bacteriocin from *Lactobacillus plantarum* PMU 33 strain isolated from som-fak, a Thai low salt fermented fish product. **Asia Pacific Journal of Molecular Biology and Biotechnology**. 17(1): 19–25, 2009.

NOUT, M. J. R. Fermented foods and food safety. **Food Research International**, v. 27, n. 7, p. 291-298, 1994.

NOVICK, R.P.; GEISINGER, E. Quorum Sensing in Staphylococci. **Annual Review Genetic**, v. 42, p.541-564, 2008.

OLIVEIRA, V. J. **Da qualidade e organização da produção ao reconhecimento de região produtora de Queijo Minas Artesanal: a experiência dos produtores da Microrregião Campos das Vertentes-MG.** 2010. 198 p. Tese (Doutorado) da Universidade Federal de Lavras. Lavras, MG 2010.

ONO, H. K.; OMOE, K.; IMANISHI, K.; IWAKABE, Y.; HU, D.L.; KATO, H.; SAITO, N.; NAKANE, A.; UCHIYAMA, T.; SHINAGAWA, K. Identification and

characterization of two novel *staphylococcal* enterotoxins, types S and T. **Infection and Immunity**. 76:4999–5005, 2008.

PEREIRA, M.L.; CARMO, L.S.; SANTOS, E.J.; PEREIRA, J.L.; BERGDOLL, M.S. Enterotoxin H in Staphylococcal Food Poisoning. **Journal of Food protection**, v. 59, n.5, p. 559-561, 1996.

PERRY, K. S. P. Queijos: Aspectos químicos, bioquímicos e microbiológicos. **Química Nova**. 27(2): 293-300, 2004

PICHLER, J.; APPL, G.; PIETZKA, A. ALLERBERGER, F. Lessons to be learnt from the outbreak of foodborne listeriosis, Austria 2009–2010. **Food Protection Trends**, 31, pp. 268–273, 2011. AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION – APHA. Standard methods for the examination of dairy products. Washington, 345 p., 1992.

PINCHUK, I. V.; BESWICK, E. J.; REYES, V. E. Staphylococcal enterotoxins. **Toxins**, v. 2, n. 8, 2010.

REID, G. Probiotic *lactobacilli* for urogenital health in women. **Journal of Clinical Gastroenterology**. (Suppl. 3), 42: 234–236, 2008.

REISER, R. F.; ROBBINS, R. N.; KHOE, G. P.; BERGDOLL, M. S. Purification and some physicochemical properties of toxic-shock toxin. **Biochemistry**; 22:3907–3912, 1983.

RENYE, J. A., SOMKUTI, G. A., GARABAL, J. I., DU, L. Heterologous production of pediocin for the control of *Listeria monocytogenes* in dairy foods. **Food Control**. 22: 1887-1892, 2011.

ROGELJ, I.; BOGOVIČ-MATIJAŠIČ, B. Bacteriocins of lactic acid Bacteria – Properties, range of inhibitory activity and methods of detection, **Food Technology and Biotechnology**. 32: 171–174, 1994.

SABIONI, J.G.; HIROOKA, E.Y.; SOUZA, M.L. Intoxicação alimentar por queijo Minas contaminado com *Staphylococcus aureus*. **Revista de Saúde pública**, S. Paulo, v. 22, p.458-61, 1988.

SANTANA, E.H.W.; BELOTI, V.; ARAGON-ALEGRO, L.C.; MENDONÇA, M.B.O.C. Estafilococos em Alimentos. Arquivos do Instituto Biológico, São Paulo, v.77, n.3, p.545-554, 2010.

SANTOS, A. S. **Queijo minas artesanal da microrregião do Serro-MG: efeito da sazonalidade sobre a microbiota do leite cru e comportamento microbiológico durante a maturação**. 2010. 68 f. Dissertação (Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Produção Animal). Faculdade de Ciências Agrárias, Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri, Diamantina, 2010.

SANTOS, J. S.; CRUZ, F. T.; MENASCHE, R. O mineiro, o queijo e os conflitos (nada poéticos) em torno dos alimentos tradicionais produzidos artesanalmente no Brasil. In: **ENCONTRO DA REDE DE ESTUDOS RURAIS: DESENVOLVIMENTO, RURALIDADES E AMBIENTALIZAÇÃO**: Paradigmas e atores em conflito, 5º, 2012, Belém. Conference Paper. UFPA, Belém (PA), 2012, 15p.

Disponível em:
<http://www.redesrurais.org.br/sites/default/files/O%20mineiro,%20o%20queijo%20e%20os%20conflitos%20em%20torno%20dos%20alimentos%20tradicionais>

[%20produzidos%20artesanalmente%20no%20Brasil.pdf](#). Acessado em: 05 de maio de 2014.

SERTÃOBRAS. **Pesquisa da UFMG garante: 14 dias de cura é suficiente para os queijos em Araxá.** Disponível em: <http://www.sertaobras.org.br/blog/2015/11/27/pesquisada-da-ufmg-garante-14-dias-e-suficiente-para-a-maturacao-de-queijos-em-araxa/>. Acessado em: 26 de julho de 2017.

SIHUFE, G. A., ZORRILLA, S. E., RUBIOLO, A. C. The effect of trichloroacetic acid on water-soluble fractions from Fynbo cheese. **Food Chemistry**. 93(2): 305-310, 2005.

SILVA, N. et al. Contagem de Bactérias e Leveduras. **Manual de Métodos de Análise Microbiológica de Alimentos**. 3(157): 99-103, 2007.

Sistema de Informação de Agravos de Notificação (SINAN net). Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância Epidemiológica, Coordenação Geral de Vigilância das Doenças Transmissíveis. Brasília, 2014.

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

SOUZA, V.; MELO, P.C.; MEDEIROS, M.I.M.; CONDE, S.O.; NADER FILHO, A. Estirpes de *Staphylococcus aureus* isoladas de queijo Minas artesanal de Araxá. **Ars Veterinaria**, Jaboticabal, SP, v.31, n.1, 019-023, 2015.

SPANU, V.; SPANU, C.; VIRDIS, S.; COSSU, F.; SCARANO, C.; DE SANTIS, E. P. L. Virulence factors and genetic variability of *Staphylococcus aureus* strains isolated from raw sheep's cheese. **International Journal of Food Microbiology**, v. 153, n. 1-2, p. 53-57, 2012.

TALLENT, S. M.; LANGSTON, T. B.; MORAN, R. G.; CHRISTIE, G. E. Transducing particles of *Staphylococcus aureus* pathogenicity island SaPI1 are comprised of helper phage-encoded proteins. **Journal of Bacteriology**. 189:7520–7524, 2007.

TODOROV, S. D.; NYATI, H.; MEINCKEN, M.; DICKS, L. M. T. Partial characterization of bacteriocin AMA-K, produced by *Lactobacillus plantarum* AMA-K isolated from naturally fermented milk from Zimbabwe. **Food Control**. 18: 656–664, 2007.

VAN CAUTEREN, D.; JOURDAN-DA SILVA, N.; WEILL, F.X.; KING, L.; BRISABOIS, A.; DELMAS, G. et al. Outbreak of *Salmonella enterica* serotype Muenster infections associated with goat's cheese, France, March 2008. **Eurosurveillance**, 14(31): 1-3, 2009.

VAN DUYNHOVEN, Y.T.; ISKEN, L.D.; BORGES, K.; BESSELS, M.; SOETHOUDT, K.; HAITSMAN, O.; MULDER, B.; NOTERMANS, D.W.; DE JONGE, R.; KOCK, P.; VAN PELT, W.; STENVERS, O.; VAN STEENBERGEN, J. Outbreak Investigation Team A prolonged outbreak of *Salmonella* Typhimurium infection related to an uncommon vehicle: hard cheese made from raw milk. **Epidemiology and Infection**, 137: 1548–1557, 2009.

- VERAS, J. F.; SANTOS, D. A.; CARMO, L. S. Levantamento de surtos de toxinfecção alimentar envolvendo leite e produtos derivados no estado de Minas
- VERNOZY-ROZAND, C.; MAZUY, C.; PERRIN, G.; HAOND, F.; BES, M.; BRUN, Y.; FLEURETTE, J. Identification of *Micrococcaceae* isolated from goat's milk and cheese in the Poitou-Charentes region. **International Journal of Food Microbiology**, 30: 373–378, 1996.
- WILSON, D.J.; GONZALEZ, R.N.; DAS, H.H. Bovine mastitis pathogens in New York and Pensilvania: prevalence and effects on somatic cell count and milk production. **Journal of Dairy Science**, v.80, p.2592-2598, 1997.
- WINKELSTRÖTER, L.K.; GOMES, B.C.; THOMAZ, M.R.S.; SOUZA, V.M.; DE MARTINIS, E.C.P. *Lactobacillus sakei* 1 and its bacteriocin influence adhesion of *Listeria monocytogenes* on stainless steel surfasse. **Food Control**. 22: 1404–1407, 2011.
- ZAFFARI, C. B.; MELLO, J. F.; COSTA M. Qualidade Bacteriológica de Queijos Artesanais comercializados em Estradas do Litoral Norte do Rio Grande do Sul, Brasil. **Ciência Rural**. 37(3): 862-867, 2007.
- ZAPATA, S.; MUÑOZ, J.; RUIZ, O. S.; MONTOYA, O.; GUTIÉRREZ, P. A. Aislamiento de *Lactobacillus plantarum* LPBM10 y caracterización parcial de su bacteriocina. **VITAE - Revista de la Facultad de Química Farmacéutica**. 16: 75-82, 2009.
- ZELL, C.; RESCH, M.; ROSENSTEIN, R.; ALBRECHT, T.; HERTEL, C.; GÖTZ, F. characterization of toxin production of coagulase-negative staphylococci isolated from food and starter cultures. **International Journal of Food Microbiology**, 127, p. 246-251, 2008.
- ZHANG, S.; IANDOLO, J. J. STEWART, C. The enterotoxin C plasmid of *Staphylococcus aureus* encodes a second enterotoxin determinant (SEJ). **FEMS Microbiology Letters**, v. 168, p. 227-233, 1998.
- ZHAO, T.; DOYLE, M. P.; ZHAO, P. Control of *Listeria monocytogenes* in a biofilm by competitive-exclusion microorganisms. **Applied and Environmental Microbiology**. 70: 3996–4003, 2004.

CAPÍTULO 2 – DIAGNÓSTICO DO PROCESSO DE FABRICAÇÃO DE QMA NA REGIÃO DA SERRA DA CANASTRA

Resumo

A Serra da Canastra é uma tradicional região produtora de QMA há mais de 200 anos, sendo ainda hoje uma atividade responsável pelo sustento de diversas famílias. O objetivo do estudo foi diagnosticar o processo de fabricação de QMA em 20 propriedades cadastradas junto ao IMA (Instituto Mineiro de Agropecuária) na região da Serra da Canastra, por meio de questionário semiestruturado. Observou-se que 60% dos produtores têm entre 41 e 60 anos e produzem QMA há cerca de 11 a 20 anos (30%). Quanto ao período de maturação, somente 27% comercializam os queijos com mais de 21 dias de maturação, conforme recomendações do IMA. Para 65% dos produtores, a atividade queijeira é a única fonte de renda da família e, desses, em 60% dos casos é o próprio dono da propriedade que fabrica o QMA, evidenciando a característica de atividade familiar. Sobre as instalações, constatou-se que a maioria das propriedades (80%) aplicavam as BPF, com ausência de focos de insalubridade nas queijarias e adjacências. Uma única propriedade apresentou péssimas condições higiênicas. Todos os produtores afirmaram ter recebido auxílio do IMA ou EMATER sobre a higienização das instalações. Quanto à saúde, 100% dos queijeiros fazem exames periodicamente. Cerca de 80% dos queijeiros utilizam vestimentas adequadas e afirmam ter recebido direcionamento para implementação das Boas Práticas de Fabricação de QMA. Todos os produtores abordados utilizam o pingão como fermento e afirmaram adquirir o pingão do vizinho quando ocorre contaminação dos seus queijos. De um modo geral, os produtores estão satisfeitos com a fabricação de QMA, porém afirmaram que faltam incentivos para a atividade.

1. INTRODUÇÃO

Segundo a Portaria nº 523 de 2002 (IMA, 2002), entende-se por Queijo Minas Artesanal o “produto elaborado conforme a tradição histórica e cultural da região do Estado onde for produzido, a partir do leite cru, hígido, integral, recém ordenhado, retirado e beneficiado na propriedade de origem e que, ao final,

apresente todas as características físico-químicas, microbiológicas, sensoriais e de textura dos queijos artesanais”.

Atualmente, são reconhecidas pelo IMA como tradicionais produtoras de QMA as regiões de Araxá, Campo das Vertentes, Serra do Salitre, Triângulo Mineiro, Cerrado e, com um maior destaque, as regiões do Serro e da Serra da Canastra (IMA, 2017a).

A microrregião da Serra da Canastra é composta pelos municípios de Bambuí, Delfinópolis, Tapiraí, Medeiros, São Roque de Minas, Vargem Bonita e Piumhi, até o início de 2017, quando o IMA reconheceu um novo município, São João Batista do Glória, como produtor do queijo Canastra (IMA, 2017b). A produção de QMA nessa região envolve cerca de 1500 famílias, gerando um contingente de mais de 5.700 toneladas de queijos por ano (EMATER, 2017).

Embora um grande número de famílias esteja envolvido na fabricação desse tipo de queijo, somente 47 produtores da Serra da Canastra estão cadastrados junto ao Instituto Mineiro de Agropecuária (IMA, 2017c). O cadastramento que é uma exigência desde o ano de 2002, visa certificar as condições higiênico-sanitárias das propriedades que fabricam o Queijo Minas Artesanal, observando a higiene pessoal, o processo da ordenha, a elaboração, instalações, o armazenamento e o transporte para comercialização do produto, além da sanidade do rebanho (MINAS GERAIS, 2002).

Por meio de questionário, objetivou-se diagnosticar o processo de fabricação de QMA em propriedades cadastradas ao IMA na região da Serra da Canastra, incluindo os aspectos socioeconômicos e as condições higiênicas das instalações de produção desses queijos.

2. METODOLOGIA

2.1. Método diagnóstico - pesquisa in loco

O diagnóstico das condições de processamento dos QMA produzidos na região da Serra da Canastra foi realizado por meio de entrevista semiestruturada a 20 produtores, em um universo de 47 propriedades cadastradas ao Instituto Mineiro de Agropecuária (IMA). Para isso, utilizou-se de questionário (Material complementar I) e os critérios de classificação apresentados por Pinto et al. (2004), incluindo: 1) Informações gerais; 2) Obtenção da matéria-prima; 3) Queijaria; 4) Acondicionamento e destino do lixo; 5) Condições do reservatório; 6) Criação de animais; 7) Manipuladores; 8) Equipamentos e utensílios diretamente relacionados ao processamento; 9) Processo de limpeza dos equipamentos e utensílios; 10) Processo de fabricação dos queijos; 11) Destino do soro; 12) Embalagem; 13) Opinião do produtor sobre a atividade queijeira.

Os produtores responderam aos questionários em suas unidades, onde assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Anexo II), proposto, avaliado e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da Universidade Federal de Viçosa (Processo nº 611.817 – Anexo III).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Caracterização dos produtores

Embora o estudo tenha abrangido 47% das propriedades cadastradas junto ao IMA, nem todos os municípios foram contemplados. Foram aplicados questionários a produtores de São Roque de Minas, Medeiros, Tapiraí e Bambuí.

Dos 20 produtores que responderam aos questionários, aproximadamente 61% tem entre 41 e 60 anos de idade (Figura 1). A maioria (30%) produz QMA entre 11 e 20 anos. Apenas 2 produtores com idade acima de 60 anos ainda produzem queijo e ambos exercem essa atividade há mais de 31 anos. A prevalência de produtores jovens e o baixo número de produtores idosos é uma indicação da manutenção da tradição de repassar o conhecimento e a atividade às próximas gerações. Dos 2 produtores com mais de 60 anos que ainda fabricam QMA, um não possui filhos o que explica o fato desse produtor permanecer na atividade mesmo com idade mais avançada, uma vez que não há a quem repassar seus conhecimentos para dar continuidade à atividade.

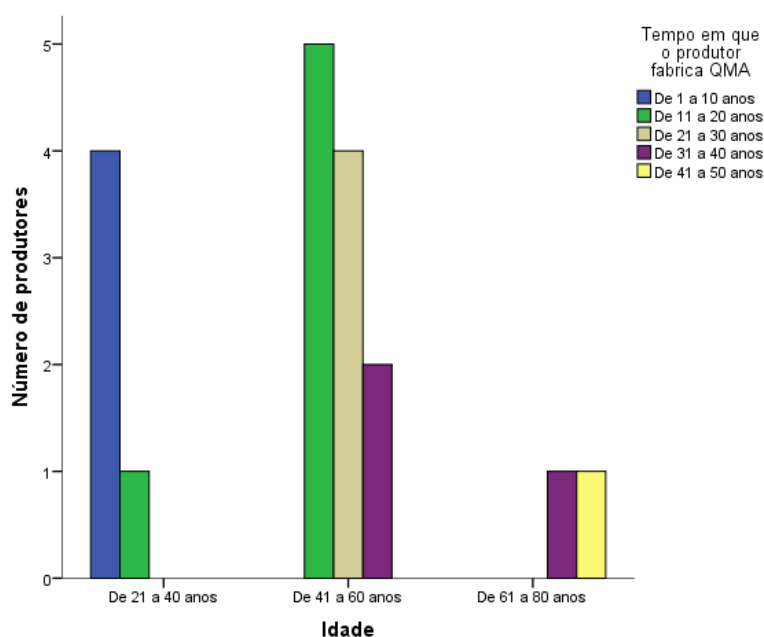


Figura 1 - Faixa etária dos produtores e o tempo que os mesmos exercem a atividade de produção de QMA na região da Serra da Canastra.

Nas propriedades estudadas, 5% dos queijeiros possuem ensino fundamental incompleto, 30% possuem ensino fundamental completo, 35% ensino médio incompleto e 30% possui o ensino médio completo.

Na maioria das propriedades visitadas, a produção diária de QMA é superior a 20 kg. No município de Medeiros, onde um maior número de questionários foi aplicado (50%) (Figura 2), grande parte dos produtores fabricam mais de 21 kg de queijo por dia, chegando alguns deles a produzirem mais de 50 kg. Em São Roque de Minas, a produção diária variou de 1 a 30 kg, enquanto que em Tapiraí, a produção foi maior (11 a 40 kg). No município de Bambuí, um único produtor foi avaliado e apresentou uma produção máxima de 10 kg de queijos por dia.

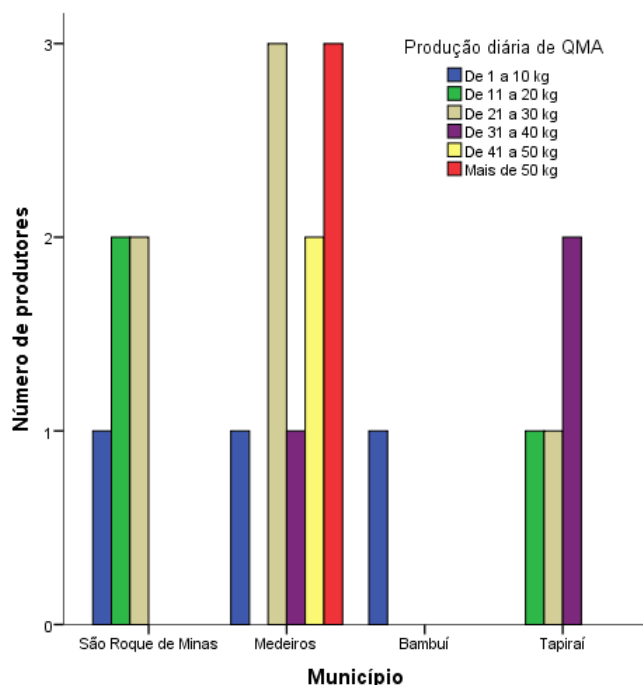


Figura 2 - Produção diária de QMA por município

A peça do queijo é vendida por até 10 reais por 15% dos produtores, enquanto 55% recebe entre 11 e 20 reais, 25% entre 21 e 30 reais e somente 5% vende os queijos entre 41 e 50 reais, que representa um único produtor residente de São Roque de Minas. A valorização do queijo nesse município pode estar relacionada às várias reportagens feitas sobre a atividade queijeira nessa região, incluindo uma recente premiação recebida por um produtor, que conquistou medalha de prata no Concurso Mundial de queijo e produtos lácteos

realizado na França, o que proporcionou maior notoriedade a este município (SERTÃOBRAS, 2015).

Em 20% das propriedades, os queijos são comercializados após 1 a 5 dias de fabricação, 35% após 6 a 10 dias, 10% após 16 a 20 dias e 20% após 21 dias de maturação e 15% não responderam a essa questão. A maioria dos produtores não consideram o prazo mínimo de maturação dos QMA, que para a Serra da Canastra é de 22 dias (IMA, 2013), comercializando seu produto antes do prazo. No município de São Roque de Minas, 3 dos 5 produtores avaliados comercializam os queijos com mais de 20 dias de maturação. Essa prática pode ser mais um dos motivos para o valor agregado aos QMA oriundos desse município. Embora seja uma tendência do mercado, a demanda por QMA frescos é cada vez maior. No entanto, de acordo com as normas vigentes, essa prática configura um risco em potencial, devido à possibilidade de carrear microrganismos patogênicos que podem causar intoxicações aos consumidores.

Os produtores afirmaram comercializar os seus queijos no município onde os mesmos são fabricados, em outros municípios e até mesmo em outros estados (Tabela 1).

Tabela 1 –Diferentes destinos dos QMA produzido na região da Serra da Canastra.

Destino dos queijos	Resposta dos produtores	Percentual (%)
Município de origem	Sim	25
	Não	75
Outros municípios	Sim	80
	Não	20
Outros estados	Sim	45
	Não	55

A comercialização de QMA para outros estados é permitida somente para os produtores registrados pelo IMA e inseridos no Sistema Brasileiro Inspeção de Produtos de Origem Animal (SISBI/POA). Por isso, O IMA instituiu em julho de 2013 a Portaria nº 1.323, com objetivo de padronizar o sistema de qualidade, diminuir a burocracia para adesão ao SISBI/POA e facilitar o trânsito comercial de produtos para fora do Estado. A partir da publicação dessa portaria, todos os

estabelecimentos registrados no serviço de inspeção do IMA poderiam ser automaticamente inseridos no Sistema Brasileiro de Inspeção de Produtos de Origem Animal (SISBI/POA), desde que tivessem implantados, no mínimo, os manuais de Boas Práticas de Fabricação (BPF), Procedimentos Padrão de Higiene Operacional (PPHO) como programas de autocontrole e possuir registros auditáveis (BRASIL, 2013).

A maioria dos produtores (50%) afirmaram vender os queijos tanto para comerciantes como para intermediário, como mostra a Figura 3. Esses queijos são comercializados em diferentes locais de distribuição como feiras livres, supermercados, padarias e mercearias.

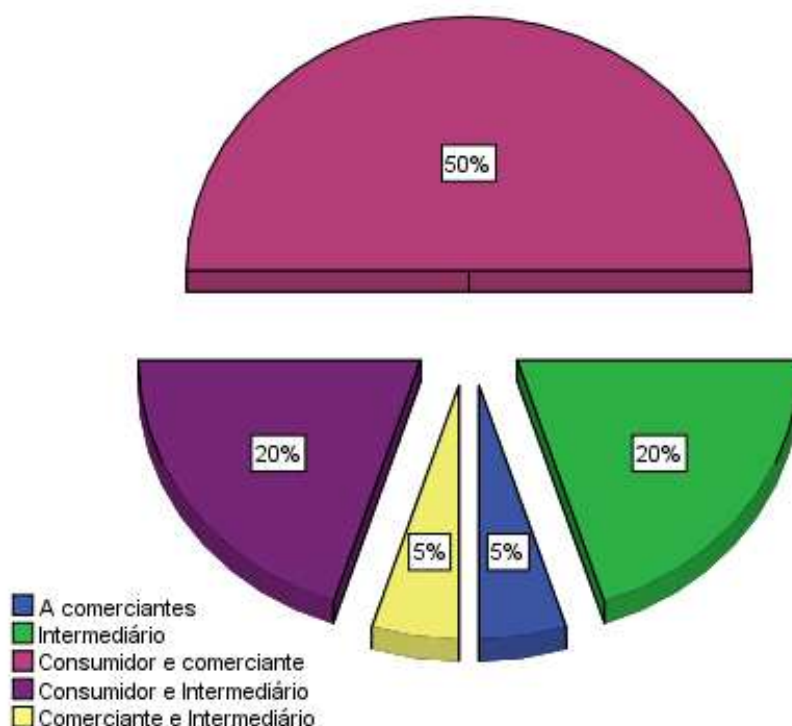


Figura 3 – Formas de comercialização dos QMA da Serra da Canastra

Em um universo de 20 respondentes, 13 (65%) afirmam que a produção de QMA é a única fonte de renda da família. Desses, 69,2% têm de 4 a 6 pessoas dependendo dessa renda. Em 60% das propriedades, o queijo é produzido pelo proprietário. Esses dados evidenciam a produção de QMA como uma atividade familiar, além de mostrar sua importância para o sustento das famílias envolvidas.

A maioria dos proprietários pertencem a alguma entidade de classe (85%), como cooperativas, que auxiliam os produtores a implementar melhorias nas queijarias por meio de treinamentos, palestras e reuniões e 90% afirmaram participar das reuniões promovidas pelas entidades de classe sempre que convidado. Todos acreditam que essa prática é uma forma importante de troca de conhecimentos, além de contribuir para união e fortalecimento da classe de produtores. 85% dos produtores já participaram de algum tipo de treinamento relacionado à produção de queijos em diferentes épocas como mostra a Tabela 2.

Tabela 2 – Participação dos produtores da Serra da Canastra em treinamentos relacionados à produção de queijos.

Data do último treinamento	Produtores participantes (%)
De 1 a 3 anos atrás	45
De 4 a 6 anos atrás	5
De 7 a 9 anos atrás	25
Há mais de 10 anos atrás	10
Não participou	15

3.2. Obtenção da matéria-prima

Dos 20 produtores, 95% fazem a ordenha do leite com ordenhadeira mecânica e 90% iniciam a produção dos queijos em menos de uma hora e meia após o início da ordenha, como exigido pelo Decreto nº 42.645 de 2002 (MINAS GERAIS, 2002). Essa exigência é uma forma de minimizar o tempo em que o leite permanece aguardando o início da fabricação dos QMA, visando minimizar a contaminação microbiana.

Na região da Serra da Canastra, o rebanho é composto por raças variadas, com predominância (65%) da raça Girolando. A maioria dos produtores tem entre 41 e 70 cabeças de gado como pode ser observado na Figura 4e, quanto ao tamanho do rebanho, somente 35% investiram na atividade nos últimos anos. Do restante, 50% mantiveram o tamanho e 15% tiveram redução do número de animais. Alguns produtores afirmaram ter reduzido o tamanho de seus rebanhos devido a morte de alguns animais, por falta de mão-de-obra e para melhoria na qualidade genética do rebanho.

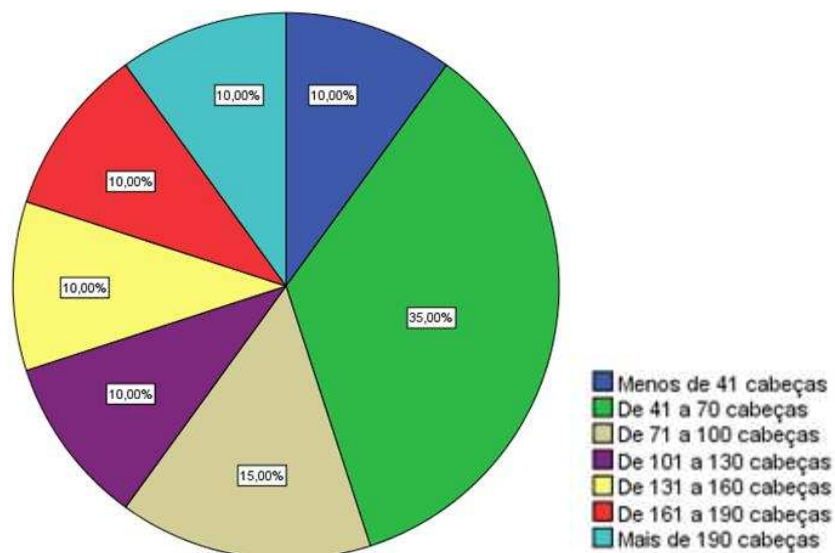


Figura 4 - Tamanho do rebanho dos produtores da Serra da Canastra em percentual

Dos 20 produtores, 60% afirmaram fornecer capim meloso, braquiária e silagem ao seu rebanho. A maioria dos produtores (85%) informou que a alimentação do rebanho interfere na qualidade do queijo, sendo que para alguns deles, uma silagem de má qualidade pode proporcionar cheiro de capim aos queijos.

Além do gado, todas as propriedades estudadas apresentaram outros tipos de criação na fazenda, sendo que 75% dos produtores criam aves e suínos. Em 60% das fazendas, as criações ficam a mais de 50 metros de distância da queijaria (Figura 5). O livre acesso de animais aos currais e sala de ordenha são fontes potenciais de contaminação, podendo veicular microrganismos indesejáveis, incluindo patogênicos ao leite. Por isso, a legislação proíbe a circulação de animais domésticos na área produtiva além de exigir a construção de galinheiros e pocilgas distantes da queijaria, porém não especifica a distância mínima permitida (MINAS GERAIS, 2002).

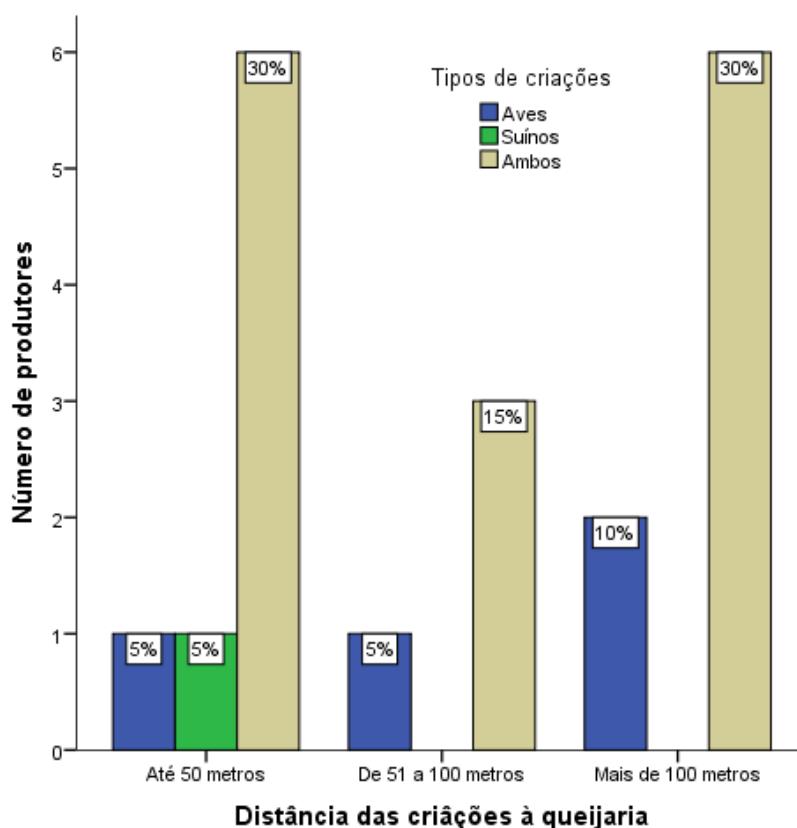


Figura 5- Tipos de criações das fazendas e a distância que as mesmas se encontram das queijarias da região da Serra da Canastra

3.3. Sobre as instalações das queijarias

A maioria das propriedades (80%) não apresentou focos de insalubridade na queijaria e adjacências, como por exemplo presença de moscas, janelas sem proteção, animais domésticos próximos à queijaria, etc. Em uma das propriedades, observou-se a presença de caixa d'água sem tampa com larvas de mosquitos, água acumulada no chão batido, depósito de soro aberto e animais soltos, resultando em más condições higiênico-sanitárias que podem comprometer a qualidade microbiológica dos QMA produzidos nessa propriedade. A presença de animais domésticos foi constatada em 75% das propriedades. Embora algumas propriedades tenham apresentado focos de insalubridade, de um modo geral, 50% das queijarias apresentavam boas condições de higiene, 45% condições excelentes e 5% apresentaram más condições de higiene.

Quanto aos aspectos de construção das queijarias, 70% têm piso de cerâmica, 10% de cimento. As paredes são revestidas com tinta lavável em 30% das propriedades, com azulejo em 35% e com ambos em 15%. Queijarias com forro de PVC é o mais comum entre as propriedades estudadas (45%) seguidas por forro de laje (30%) e telha de cerâmica (5%). Não houve respostas dessas questões por parte de 20% dos produtores por motivos desconhecidos.

Quanto à iluminação, 30% dos produtores utilizam somente a iluminação natural na queijaria e 70% usam a iluminação natural e a artificial. Todas as queijarias possuem sistema de ventilação adequado.

Os produtores estudados receberam indicações da localização, bem como de aspectos relacionados às instalações das queijarias de órgãos estaduais como o IMA (30%) (Instituto Mineiro de Agropecuária), EMATER-MG (Empresa de Assistência Técnica e Extensão Rural do Estado de Minas Gerais) (15%) ou ambos (55%).

A higienização das queijarias em 95% das propriedades utiliza-se o cloro como sanitizante e 5% não utiliza sanitizante. O cloro sempre foi utilizado como sanitizante por 70% dos produtores e, os 30% que afirmaram ter passado a utilizar o cloro, fizeram por exigência da Portaria nº 523 de 2002 (IMA, 2002). A maioria (70%) afirmou que o uso do cloro não alterou as características do QMA, 20% acredita ter melhorado e 10% acha que o uso do cloro influenciou negativamente nas características do queijo. O IMA e/ou EMATER também contribuíram com informações e instruções/treinamento aos produtores sobre a higienização adequada das queijarias e suas instalações.

Outro aspecto importante para uma higiene adequada é a qualidade da água utilizada. Nas propriedades estudadas, 75% utilizam a água da mina. Embora não tenha sido contemplado no questionário a presença ou ausência de cloração da água, a Portaria nº 1305 de 2013 exige não só que a água seja clorada, mas também que haja um controle da concentração de cloro da água além de realizar análises físico-químicas e microbiológicas (IMA, 2013),

3.4. Aspectos relacionados à saúde e higiene do queijeiro

Em todas as propriedades, o queijeiro faz exames periódicos e possui carteira de saúde. Quanto ao uso de vestimentas apropriadas para a fabricação de queijo, todos afirmaram ser importante o uso de EPI (Equipamentos de

proteção individual). A maioria dos produtores afirmaram utilizar vestimenta adequada para produção de QMA, conforme mostrado na Tabela 3.

Tabela 3 - Aspectos relacionados ao uso de vestuário adequado para produção de Queijo Minas Artesanal produzido na Serra da Canastra.

	Roupas limpas	Jaleco ou avental	Botas	Touca
Sim	18	17	18	17
Não	2	3	2	3

Os hábitos higiênicos dos manipuladores (asepsia das mãos, tabagismo, presença de afecções) foram considerados adequados em todas as propriedades embora um manipulador tenha apresentado afecções respiratórias. Observou-se um bom asseio pessoal (unhas curtas, ausência de adornos, roupas limpas) em 90% das propriedades e regular em 10% delas.

Apesar de nem todos os estabelecimentos seguirem rigorosamente os hábitos higiênicos exigidos pela legislação vigente (IMA, 2002), 95% dos produtores afirmaram ter recebido direcionamento para implementação das Boas Práticas de Fabricação (BPF) de QMA e 5% não receberam nenhum tipo de direcionamento. As BPF são um conjunto de normas empregadas em produtos, processos e edificações que visam à promoção e à certificação da qualidade e segurança do alimento (BRASIL, 1997) e, para os QMA, essas normas vêm sendo exigidas desde o ano de 2002 (MINAS GERAIS, 2002). O direcionamento para implementação das BPF foi feito de diversas formas, incluindo treinamentos, palestras e guia técnico como mostra a Figura 6. Os órgãos normalmente envolvidos nesse direcionamento são IMA e EMATER, embora o Sebrae também tenha contribuído.

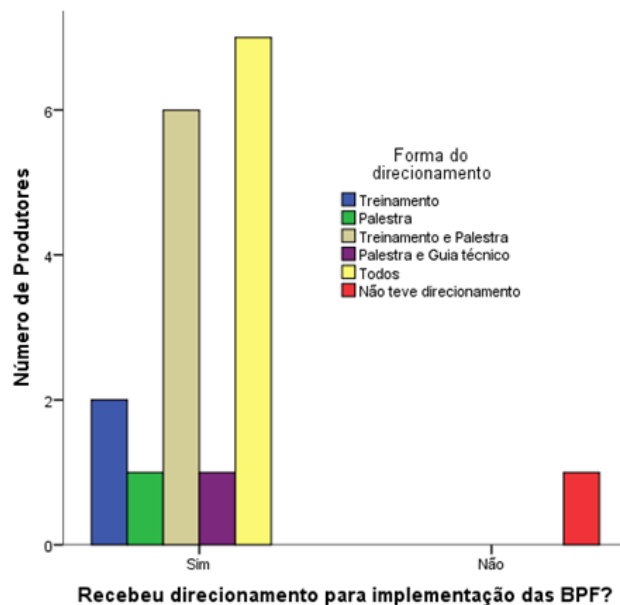


Figura 6 - Forma de direcionamento que os produtores de Queijo Minas Artesanal da Serra da Canastra receberam para implementação das BPF

3.5. Processo produtivo de QMA

A produção do QMA da Serra da Canastra se inicia logo após a ordenha do leite como detalhado na Figura 7.

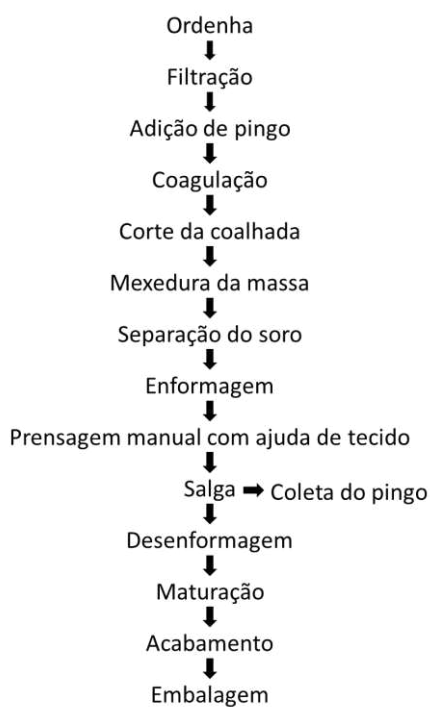


Figura 7- Esquema de produção de Queijo Minas artesanal produzido na região da Serra da Canastra

A filtração do leite na maioria das propriedades (65%) é feita com o tecido conhecido como “volta ao mundo”, um tecido sintético feito de nylon. Após a filtração, a coagulação do leite é feita em tambores plásticos e a mexedura feita principalmente com espátula de plástico (55%), aço inox (30%), madeira (10%) ou lira de metal (5%). O tecido “volta ao mundo” também é utilizado na dessoragem dos queijos artesanais produzidos em 90% das propriedades estudadas.

Por exigência da Portaria nº 518 de 2002 (MINAS GERAIS, 2002), as bancadas de madeiras para fabricação dos QMA foram substituídas por bancadas de ardósia (85%) ou aço inox (15%) e as formas de madeira substituídas principalmente por formas de plástico (90%). Quanto à bancada de maturação dos queijos, a madeira está presente em 100% das propriedades, sendo permitida pela legislação vigente (MINAS GERAIS, 2002). Segundo os produtores, a substituição das bancadas e formas de madeira promoveu alterações nas características dos queijos. De acordo com os produtores, as bancadas mais lisas e frias, sem a rugosidade da madeira, fizeram com que os queijos começassem a melar devido a maior dificuldade de exsudação do soro, o que é considerado uma perda para os produtores. Sabe-se que os utensílios de madeira antes utilizados, promovem a formação de biofilme composto principalmente por bactérias lácticas e leveduras que, junto da microbiota do fermento endógeno, contribuem para a maturação dos queijos (LORTAL et al., 2009).

No tanque de fabricação e na bancada de enformagem utilizados para produção de QMA, todos os produtores afirmaram realizar a pré-lavagem. Destes, 95% realizam a lavagem (com sabão) no tanque e 55% na bancada, já o uso do cloro como sanitizante é utilizado somente em 60% das propriedades em ambos os utensílios. 95% dos produtores afirmaram realizar a pré-lavagem, 70% realizam a lavagem e 65% usam sanitizante na limpeza dos tecidos e utensílios empregados. Embora nem todos os produtores realizam a sanitização de seus utensílios, a Portaria nº 523 de julho de 2002 exige que após a fabricação dos QMA, todos os utensílios sejam lavados e higienizados (IMA, 2002).

Todos os produtores avaliados na produção do QMA da região da Serra da Canastra utilizam e sempre utilizaram o pingo como fermento na produção

dos queijos. O pingo é o soro obtido da dessoragem dos queijos após a salga e adicionado ao leite para direcionar a fermentação na produção do dia seguinte. Quando há algum tipo de contaminação no pingo, da qual é caracterizada pela produção de gás no queijo, o pingo coletado não é utilizado para a produção seguinte e então é substituído.

A contaminação dos queijos acontece mais de 2 vezes ao ano em 45% das propriedades estudadas, 2 vezes ao ano em 25%, uma vez ao ano em 15% e nunca aconteceu ou raramente aconteceu em 15% das propriedades. Quando esse tipo de situação ocorre, inviabiliza o uso do pingo obtido dos queijos contaminados e os produtores costumam adquirir um novo pingo do vizinho (85%), embora outras alternativas tenham sido apresentadas, como a manutenção de uma reserva de fermento congelado ou a produção de um novo queijo e conseqüentemente um novo pingo. Um único produtor afirmou nunca ter tido problemas de contaminação.

Os queijos contaminados são vendidos por menores valores em 50% das fazendas e em 30% são utilizados no preparo de quitandas. Outros produtores afirmaram ainda vender do mesmo jeito, deixar maturar ou dar aos animais (Figura 8). A prática de vender os queijos contaminados caracterizados pela produção precoce de gás é amplamente praticada no mercado, bem como a procura por queijo “rendados” nos pontos de vendas. Esse comportamento do consumidor, provavelmente é movido por falta de informações de que essas características físicas advêm de falhas na aplicação de BPA e BPF na produção do QMA.

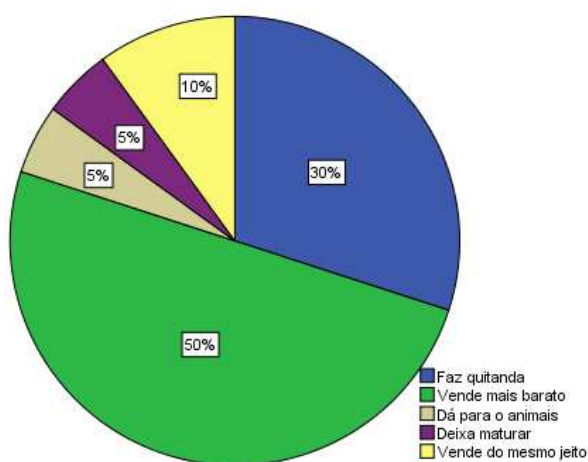


Figura 8 - Destino do QMA contaminado

Quanto ao processo de fabricação dos QMA, em 95% das propriedades o tempo de coagulação dos queijos é inferior a 50 min, graças ao efeito associado do coalho e a microbiota do leite cru e do pingo. A prensagem é realizada com auxílio de um tecido por todos os produtores. A salga dos queijos é feita com sal grosso em 45% das propriedades, com sal refinado em 50% e com os dois tipos de sal em 5%. Na legislação atual, não há exigências para a concentração e nem para o tipo de sal a ser utilizado, desde que seja utilizado sal marinho destinado ao consumo humano (MINAS GERAIS, 2002).

Ao final do processo de fabricação dos queijos, é comum realizar a lavagem do queijo antes de colocá-los para maturar. Em 85% das propriedades, essa lavagem é realizada somente com água e em 15% com água e soro. Os produtores afirmaram lavar os queijos com soro somente no período temperaturas baixas, para auxiliar na maturação. O soro resultante da produção é fornecido aos animais em todas as propriedades estudadas. O soro, devido ao seu alto teor nutritivo, é um dos efluentes líquidos que mais contribuem para a alta carga poluidora das indústrias de laticínios (BARBOSA et al., 2009). Por isso, a Portaria nº 523 estabelece que quando não for possível utilizar o soro na alimentação animal, que o mesmo seja tratado adequadamente antes de ser descartado na rede de esgoto (IMA, 2002).

3.6. Embalagem

Dos 20 produtores, 25% afirmaram utilizar filme PVC para embalar os QMA, 25% cryovac, 35% saco plástico, 10% papel manteiga e 20% dos produtores não embalam seus queijos. A maioria dos produtores (65%) acreditam que a embalagem é importante pois protege os queijos contra sujidades externas e contra contaminação, 30% dos produtores afirmaram não ser necessária a embalagem e 5% deles acreditam que a embalagem só é necessária para queijos frescos, embora não seja permitida a comercialização dessa categoria de queijo.

Informalmente os produtores afirmam que a própria casca é a embalagem do queijo e, portanto, só utilizam embalagens por exigência do Decreto nº 44.864 de agosto de 2008 (MINAS GERAIS, 2008) ou porque os consumidores preferem os queijos embalados por questões de higiene.

Os queijos produzidos em 90% das propriedades estudadas possuem número de identificação. Além de ser uma exigência da Lei nº 14.185 de janeiro de 2002 (MINAS GERAIS, 2002), para os produtores, essa é uma forma de evitar a falsificação dos queijos artesanais da Serra da Canastra.

3.7. Impressão Global

Embora 55% dos produtores afirmaram estarem muito satisfeitos e 35% satisfeitos com a produção de QMA, muitos informaram que a atividade precisa de mais incentivos. Eles afirmaram que continuam a produzir QMA porque gostam e que o intermediário é quem fica com a maior parte lucro nessa atividade. Ainda assim, alguns produtores afirmam ser melhor ter uma menor margem de lucro nas vendas dos queijos a ter que trabalhar em outras atividades como empregados para se sustentar.

Desde 2002 o governo de Minas Gerais, juntamente com a Emater-MG e Instituto Mineiro de Agropecuária (IMA), desenvolve o programa do Queijo Minas Artesanal, que tem como objetivo desenvolver a cadeia dos queijos artesanais mineiros, trazendo renda para os produtores, desenvolvimento regional e segurança alimentar. Um convênio entre a EMATER-MG e o MAPA (Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento) estabelecido no início de 2017, estabelece mais incentivos para o programa QMA. O convênio prevê o atendimento a 600 produtores dos 75 municípios inseridos nas sete regiões produtoras caracterizadas, buscando a melhoria da produção e a qualidade dos queijos, por meio de capacitação de extensionistas, capacitação de produtores em boas práticas de agropecuária e boas práticas de fabricação, realização de dias de campo em propriedades com queijarias, a impressão de material técnico, além da compra e distribuição de insumos para serem doados aos produtores contemplados no programa (TERRAVIVA, 2017a). Além do incentivo ao programa Queijo Minas Artesanal, o governo liberou ainda recurso para ser utilizado para aprimorar a produção do Queijo Minas Artesanal (QMA) e para fomentar novas pesquisas sobre a produção de leite e derivados (TERRAVIVA, 2017b). Esses incentivos do governo constituem um avanço para a melhoria na qualidade dos QMA e para sua valorização.

4. CONCLUSÃO

Observou-se que a tradição de fabricar queijo Minas artesanal continua sendo uma atividade importante na Região da Serra da Canastra, sendo responsável pelo sustento de grande parte das famílias. Quanto às condições das instalações da queijaria e as Boas práticas de Fabricação exigidas pela Portaria nº 523 de 2002 (IMA), 19 das 20 propriedades estudadas apresentaram condições satisfatórias de higiene (queijaria limpa, bom asseio pessoal, ausência de afecções, etc.).

Embora a maioria dos produtores tenha afirmado satisfação com a atividade, alguns mencionaram a necessidade de maiores incentivos e afirmaram continuar exercendo essa atividade pela experiência que já têm na atividade, uma vez que o retorno financeiro ainda é baixo. Dessa forma, o estudo reforça a satisfação no exercício da atividade por parte dos produtores como uma forma de manter a tradição centenária de fabricação de QMA.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BARBOSA, C.S.; MENDONÇA, R.C.S; SANTOS, A.L.; PINTO, M.S. Aspectos e impactos ambientais envolvidos em um laticínio de pequeno porte. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, 366 (64): 28-35, 2009

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Instrução Normativa nº 30 de 07 de agosto de 2013. Dispõe sobre a comercialização de queijos artesanais elaborados com leite cru**. Brasília: Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, 2013. Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br/>. Acessado em 24 de abril de 2017.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Portaria nº 368 de 4 de setembro de 1997. **Regulamento técnico sobre as condições higiênico-sanitárias e de boas práticas de fabricação para estabelecimentos elaboradores/industrializadores de alimentos**. 1997.

EMPRESA DE ASSISTÊNCIA TÉCNICA E EXTENSÃO RURAL DO ESTADO DE MINAS GERAIS/EMATER-MG. **Mapa do Queijo Minas Artesanal**. 2017. Disponível em: http://www.emater.mg.gov.br/portal.cgi?flagweb=site_pgn_downloads_vert&grupo=135&menu=59. Acesso em 15 março de 2017.

INSTITUTO MINEIRO DE AGROPECUÁRIA - IMA. Portaria nº 1305, de 30 de abril de 2013. **Estabelece diretrizes para a produção do queijo Minas artesanal**. 2013.

INSTITUTO MINEIRO DE AGROPECUÁRIA – IMA. Portaria nº 1323, de 08 de julho de 2013. Normas aplicáveis à inclusão no sistema brasileiro de inspeção de produtos de origem animal (SISBI/POA) de estabelecimentos de Produtos de origem animal. 2013.

INSTITUTO MINEIRO DE AGROPECUÁRIA – IMA. **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**. 2002.

INSTITUTO MINEIRO DE AGROPECUÁRIA – IMA. 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.

INSTITUTO MINEIRO DE AGROPECUÁRIA – IMA. **Queijo Minas Artesanal**. Disponível em: <http://www.ima.mg.gov.br/queijo-minas-artesanal>. Acessado em: 10 de março de 2017a.

INSTITUTO MINEIRO DE AGROPECUÁRIA. IMA. **IMA reconhece São João Batista do Glória como produtor de Queijo Minas Artesanal**. Disponível em: <http://www.ima.mg.gov.br/acontece-no-ima/2039-ima-reconhece-sao-joao-batista-do-gloria-como-produtor-de-queijo-minas-artesanal>. Acessado em: 21 de abril de 2017b.

INSTITUTO MINEIRO DE AGROPECUÁRIA. **Produtores de queijos Minas artesanal**. Disponível em: http://www.ima.mg.gov.br/material-curso-cfo-cfoc/doc_details/680-produtores-queijo-minas-artesanal-. Acessado em: 7 de março de 2017c.

LORTAL, S.; DI BLASI, A.; MADEC, M.N.; PEDILIGGIERI, C.; TUMINELLO, L.; TAGUY, G.; FAUQUANT, J.; LECUONA, Y.; CAMPO, P.; CARPINO, S.;

LICITRA, G. Tina wooden vat biofilm: A safe and highly eficiente lactic acid bactéria delivering system in PDO Ragusano cheese making. **International Journal of Food Microbiology**, v. 132, p. 1-8, 2009.

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

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

MINAS GERAIS. Lei 14.185, de 31 de janeiro de 2002. Dispõe sobre o processo de produção de queijo Minas artesanal e dá outras providências. 2002a. Disponível em: <https://www.almg.gov.br/consulte/legislacao/completa/completa.html?tipo=LEI&num=14185&ano=2002>. Acessado em: 26 jul. 2017.

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

SERTÃOBRÁS. **Queijo canastra ganha medalha de prata em concurso mundial na França**. Disponível em: <http://www.sertaobras.org.br/blog/2015/06/12/queijo-canastra-ganha-medalha-de-prata-em-concurso-mundial-na-franca/>. Acessado em: 04 de abril de 2017.

TERRAVIVA. **Governo garante R\$ 2,2 milhões para o Queijo Minas Artesanal**. Disponível em: http://www.terraviva.com.br/site/index.php?option=com_k2&view=item&id=12762:governo-garante-r-2-2-milhoes-para-o-queijo-minas-artesanal. Acessado em: 3 de agosto de 2017.

TERRAVIVA. **Produção de queijo Minas artesanal ganha reforço com o atendimento a 600 produtores familiares no estado**. Disponível em: http://www.terraviva.com.br/site/index.php?option=com_k2&view=item&id=10448. Acessado em: 28 de julho de 2017.

CAPÍTULO 3 – CARACTERIZAÇÃO MICROBIOLÓGICA E FÍSICO-QUÍMICA DO FERMENTO ENDÓGENO UTILIZADO NA PRODUÇÃO DE QMA DA SERRA DA CANASTRA

Resumo

O QMA da Serra da Canastra é fabricado com leite cru, coalho e pingo, um fermento endógeno rico em BAL, que juntamente com a microbiota do leite, auxilia na fermentação e maturação desses queijos. Objetivou-se avaliar as características microbiológicas e físico-químicas do pingo obtido em propriedades da região da Serra da Canastra-MG cadastradas ao IMA (Instituto Mineiro de Agropecuária). Para isso, foram coletadas amostras de pingo em 20 propriedades entre as 47 cadastradas, nas quais foram realizadas contagens de bactérias do ácido láctico (MRS e M17), mesófilos aeróbios (PCA), coliformes totais e *Escherichia coli* (Petrifilm EC 3M®) e *Staphylococcus aureus* (Petrifilm Staph Express 3M®). Os pingos foram analisados quanto ao pH, acidez titulável e cloretos. O pH dos pingos variou de 4,21 a 5,62, enquanto a acidez titulável de 0,24 a 1,18% de ácido láctico. O teor de cloretos variou de 1,91 a 4,90% NaCl. Os pingos apresentaram contagens de mesófilos aeróbios variando de 5,32 a 8,40 log UFC.mL⁻¹ (M=6,39) e de bactérias lácticas entre 3,90 a 7,67 log UFC.mL⁻¹ (M=5,64 em MRS e M=6,43 em M17). Coliformes totais foram detectados em apenas 4 amostras estudadas (0,78 a 3,26 log UFC.mL⁻¹), porém não se detectou *E. coli* na menor diluição estudada 10⁰. *S. aureus* foi encontrado em 8 amostras com concentração variando entre 1,57 a 3,18 log UFC.mL⁻¹ (M=2,21). Observou-se diversidade nas características físico-químicas e microbiológicas do pingo obtido de diferentes propriedades de uma mesma região, característica inerente ao produto artesanal. Além disso, observou-se microbiota predominantemente composta por BAL, grupo microbiano essencial para a qualidade dos QMA devido a produção de metabólitos antagonistas.

1. INTRODUÇÃO

O queijo Minas artesanal (QMA) da Canastra é fabricado com leite cru recém-ordenhado e utiliza o pingo como fermento endógeno. Esse fermento é obtido após a enformagem e salga dos queijos, quando parte do soro eliminado é coletado e utilizado na produção do dia seguinte (LIMA et al., 2009; OLIVEIRA, 2010).

A utilização do pingó faz parte do “saber-fazer” tradicional de QMA e apresenta grande importância pois esse ingrediente possui diversos grupos microbianos que, juntamente com a microbiota do leite cru, direcionam a fermentação e maturação dos QMA. Seu uso permite a inserção de uma microbiota diversificada característica da região produtora, com predominância de BAL, que são responsáveis por conferir aos queijos características sensoriais específicas, além de iniciarem a fermentação dos queijos por meio da produção de ácidos orgânicos, levando à redução do pH do leite e formação da coalhada, além de produzirem diversos metabólitos capazes de inibir o crescimento de microrganismos patogênicos, como ácidos orgânicos (KASHKET, 1987; LORCA, VALDEZ, 2009), peróxido de hidrogênio (DAECHEL, 1989; REID, 2008), diacetil (LANCIOTTI et al., 2003) e bacteriocinas (ROGELJ; BOGOVIČ-MATIJAŠIČ, 1994; COTTER, HILL, ROSS, 2005).

A presença de altas concentrações de sal (NaCl) promove a modulação da microbiota do pingó com consequente eliminação de microrganismos sensíveis ao sal, fazendo com que as BAL maturadoras sejam predominantes nesse fermento. Entretanto, microrganismos patogênicos, como do gênero *Staphylococcus*, podem estar presentes nesse fermento uma vez que o mesmo é obtido da dessoragem de queijos feitos com leite cru, uma matéria-prima altamente manipulado, que para garantir a sua qualidade microbiológica, exige práticas higiênicas adequadas.

As Boas práticas agropecuárias (BPA) e de fabricação (BPF) é uma das exigências para o cadastramento das queijarias produtoras de QMA junto ao Instituto Mineiro de Agropecuária (MINAS GERAIS, 2002). BPA e BPF são normas envolvendo produtos, processos e instalações que visam a promoção e a certificação da qualidade e segurança do alimento produzido (BRASIL, 1997). Dessa forma, a implementação das boas práticas é uma ferramenta importante para promover melhoria da qualidade microbiológica do leite cru e consequentemente, do QMA produzido nas diferentes regiões do Estado, além de ser uma das primeiras exigências para que as unidades produtoras sejam cadastradas junto ao IMA (Instituto Mineiro de Agropecuária).

Por ser um insumo obrigatório com composição físico-química e microbiológica pouco conhecida, este estudo teve como objetivo determinar as características microbiológicas e físico-químicas do pingó utilizado na

produção do QMA produzido na região da Serra da Canastra-MG em 20 propriedades cadastradas junto ao IMA (Instituto Mineiro de Agropecuária).

2. METODOLOGIA

2.1. Coleta das amostras

Amostras de aproximadamente 100 mL de pingo foram coletadas em frascos esterilizados em 20 propriedades produtoras de QMA da região da Serra da Canastra - MG, cadastradas no IMA (Instituto Mineiro de Agropecuária). As amostras transportadas sob refrigeração para o Laboratório de Culturas Láticas do Departamento de Tecnologia de Alimentos da Universidade Federal de Viçosa, onde foram mantidas sob refrigeração até o momento das análises.

2.2. Análises microbiológicas dos pingos

Uma alíquota de 1 mL de cada amostra de pingo foi adicionada a 9 mL de solução salina-triptona estéril, seguindo-se a homogeneização e diluições seriadas posteriores. As amostras foram plaqueadas em profundidade para contagem de bactérias lácticas nos meios MRS (DeMan, Rogosa e Sharpe, Merck®, Darmstad, Alemanha) e M17 (por ingrediente) (WELTHAGEN; VILJOEN, 1999) e mesófilos aeróbios em meio PCA (Plate count agar, Merck®, Darmstad, Alemanha) (APHA, 2004).

Uma vez que não há um padrão de qualidade para o pingo, neste estudo foram utilizados *Petrifilm*TM (3M Center, St. Paul, USA) EC 3M[®] para determinação de coliformes totais e *E. coli* (AOAC 991.14) e Staph Express 3M[®] para *Staphylococcus aureus* (AOAC 2003.11). Para pesquisa de patógenos indicadores de qualidade forma plaqueadas as diluições 10⁰ a 10⁻³.

Para as contagens, foram consideradas as placas que continham entre 25 a 250 unidades formadoras de colônias (UFC). Nas determinações em *Petrifilms*TM (3M Center, St. Paul, USA) foram consideradas contagens entre 15 e 150 UFC, conforme indicação do distribuidor.

2.3. Análises físico-químicas dos pingos

As determinações de pH (Bell[®], modelo: PHS3BW), acidez titulável e cloretos foram realizadas imediatamente após a chegada das amostras ao Laboratório de Culturas Láticas conforme os métodos oficiais descritos na

Instrução Normativa nº 68, Métodos Analíticos Oficiais, Físico-químicos, para controle de leite e produtos lácteos, do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), de 12 de dezembro de 2006 (BRASIL, 2006). As análises de acidez titulável e cloretos foram realizadas em duplicatas.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados de pH, acidez titulável e percentual de cloreto de sódio do pingo da Serra da Canastra estão dispostos na Tabela 1.

Tabela 1 - Valores de pH, acidez, cloreto de sódio, média e coeficiente de variação (CV) dos pingos utilizados para fabricação de queijo Minas artesanal da Serra da Canastra.

Produtor	pH	Acidez (% Ác. láctico)	Cloreto de sódio (% NaCl)
1	4,70	0,83	4,40
2	5,55	0,29	4,32
3	5,25	0,24	4,80
4	4,49	0,71	4,42
5	5,40	0,25	4,56
6	4,50	0,76	4,74
7	4,70	1,18	3,28
8	4,57	0,41	4,37
9	5,23	0,36	4,59
10	4,87	0,32	4,90
11	4,41	0,59	4,68
12	4,30	0,61	4,48
13	5,62	0,29	3,35
14	4,96	0,97	1,91
15	5,19	0,39	1,93
16	4,48	0,55	4,67
17	5,28	0,54	4,75
18	5,37	0,41	4,24
19	4,21	0,38	4,29
20	5,04	0,82	4,37
Média	4,91	0,55	4,15
CV	0,873	0,468	0,204

No presente estudo observou-se nas amostras de pingo das 20 propriedades cadastradas, uma média de pH de 4,91, 0,55% de ácido láctico e 4,15% de cloreto de sódio. Resultados similares foram encontrados por Nóbrega et al. (2008) que avaliaram o pH (4,06 a 5,40), acidez titulável (0,4 a 1,1%) e teor de cloreto de sódio (1,5 a 9,0%) de QMA da Serra da Canastra na época da seca, mesmo período em que foram coletadas as amostras no presente estudo, porém estudaram propriedades não cadastradas junto ao IMA. A alta variação observada na acidez e no teor de sal dos pingos mostram a heterogeneidade nas características dos fermentos endógenos obtidos em diferentes propriedades que fabricam QMA na Serra da Canastra, uma vez que cada produtor adiciona a quantidade de sal que julgar necessária, o que influencia diretamente na composição da microbiota do pingo, e consequentemente, na sua acidez.

O pingo, fermento endógeno utilizado na fabricação do QMA da Canastra, é coletado após a adição de sal (sal grosso ou refinado) e mantido à temperatura ambiente até o momento da produção no dia seguinte. O efeito do sal selecionando microrganismos mais tolerantes, associado à temperatura da região, permite que o pingo atinja valores médios de pH e acidez favorável ao crescimento de diversos microrganismos (NÓBREGA et al., 2008). Dentre esses microrganismos estão as BAL, fungos, leveduras e algumas bactérias contaminantes, potencialmente patogênicas como *S. aureus* (BETTS et al., 1999; GOBBETTI et al., 1999).

Não há um padrão definido para a quantidade de sal a ser adicionada aos QMA, fazendo com que cada produtor coloque a quantidade que julgar necessária conforme sua experiência, e assim, cada fermento apresenta uma microbiota única. Na época das chuvas (novembro a março), os produtores aumentam as concentrações de sal para evitar o crescimento de microrganismos indesejáveis, principalmente aqueles responsáveis pelo estufamento precoce dos queijos (NÓBREGA et al., 2008).

No presente trabalho, observou-se ausência de *E. coli* em todas as amostras de pingo, enquanto que *S. aureus* estava presente em 8 amostras, graças à tolerância desse microrganismo ao sal em concentrações de até 15% (KADARIYA, SMITH e THAPALIYA, 2014). As contagens microbianas obtidas do pingo estão dispostas na Tabela 2.

Tabela 2 – Contagem de microrganismos mesofílicos e bactérias lácticas (log UFC.mL⁻¹) média das contagens e coeficiente de variação (CV) dos pingos utilizados para fabricação de queijo Minas artesanal da Serra da Canastra.

Produtor	Mesófilos aeróbios	Bactérias Lácticas	
		MRS	M17
1	6,98	6,88	4,17
2	6,20	7,04	6,74
3	8,40	7,48	7,00
4	5,34	5,11	6,32
5	6,67	6,40	6,68
6	5,83	6,04	5,97
7	5,89	6,15	6,61
8	7,48	7,52	7,67
9	6,38	3,90	6,60
10	6,66	7,38	6,15
11	6,74	6,08	6,90
12	5,67	4,96	6,90
13	7,18	4,43	6,81
14	6,48	4,86	6,79
15	6,96	5,49	6,49
16	6,15	4,23	5,46
17	6,34	5,00	6,63
18	5,46	4,20	6,41
19	5,61	5,49	5,63
20	5,32	4,23	6,73
Média	6,39	6,04	
CV	1,198	1,742	

A prática de armazenamento do pingo à temperatura ambiente favorece o crescimento de diversos grupos microbianos mesofílicos, o que explica as altas contagens de mesófilos aeróbios nessas amostras (5,32 a 8,40 log UFC.mL⁻¹) (Tabela 2). As BAL na microbiota do pingo da Serra da Canastra, apresentaram contagens na ordem de 10⁶ UFC.mL⁻¹ (3,9 a 7,67 log UFC.mL⁻¹). Para Furtado (1980), o pingo é um autêntico fermento endógeno justamente por apresentar alta concentração de microrganismos pertencentes ao grupo de BAL, o que o torna capaz de direcionar a fermentação dos queijos. No fermento endógeno da

Serra da Canastra, os gêneros de BAL predominantes são *Lactococcus* e *Lactobacillus* (*L. plantarum* e *L. casei*) (SANTOS, 2010; DORES; FERREIRA, 2012). No entanto, se o leite utilizado na fabricação desses queijos não for ordenhado e manipulado de acordo com as BPA e de BPF, poderá representar potencial fonte de contaminação para os QMA (NÓBREGA et al., 2008; RESENDE, 2010).

Tabela 3 – Contagem de microrganismos indicadores de qualidade (log UFC.mL⁻¹), média das contagens e coeficiente de variação (CV) dos pingos utilizados para fabricação de queijo Minas artesanal da Serra da Canastra.

Produtor	Coliformes Totais	<i>Escherichia coli</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
1	<1	<1	1,76
2	<1	<1	1,57
3	<1	<1	1,67
4	<1	<1	<1
5	<1	<1	3,11
6	<1	<1	3,18
7	<1	<1	<1
8	<1	<1	<1
9	<1	<1	<1
10	0,78	<1	1,62
11	3,26	<1	2,49
12	<1	<1	<1
13	<1	<1	<1
14	<1	<1	<1
15	1,28	<1	<1
16	<1	<1	2,30
17	<1	<1	<1
18	<1	<1	<1
19	<1	<1	<1
20	1,08	<1	<1
Média	1,6	<1	2,21
CV	0,70	0	0,30

Embora não haja parâmetros legais definidos para análise de patógenos no fermento endógeno utilizado na fabricação dos QMA (NÓBREGA et al., 2008),

é importante conhecer a microbiota predominante para entender melhor o papel desse pingó no processo de fabricação dos QMA. No presente estudo, foram detectados coliformes totais em 4 propriedades, enquanto *E. coli* não foi encontrado na menor diluição pesquisada (10^{-1}). Já *S. aureus*, devido à sua maior resistência às condições de pH baixo e alta concentração de sal, pode sobreviver nesse fermento atingindo populações de 10^6 UFC.mL⁻¹ (PINTO, 2008). No presente estudo, das 20 amostras de pingó analisadas, 8 continham *S. aureus*. Dessas, 50% apresentaram contagens acima de 2 log UFC.mL⁻¹, valor máximo estipulado para os QMA (MINAS GERAIS, 2008). A presença de *S. aureus* pode comprometer a qualidade dos QMA, uma vez que alguns produtores não respeitam o período mínimo de maturação exigido por lei (IMA, 2013) para comercialização desses queijos (22 dias) e indícios de concentrações elevadas desse patógeno em queijos pode estar relacionado à presença de toxina estafilocócica, que para QMA, necessita de confirmação.

Embora tenham sido identificados focos de insalubridade na queijaria e adjacências na propriedade 17 e higienização em geral era ruim (caixa d'água destampada, soro no chão, etc. - Capítulo 2), nessa fazenda não apresentou *E. coli* e *S. aureus* no fermento nas diluições estudadas (<10). Esses resultados indicam que as condições insatisfatórias de higiene das queijarias e adjacências não implicam diretamente em um produto com qualidade microbiológica comprometida, sugerindo maiores especificações ao se avaliar este quesito. Da mesma forma, em instalações com higiene aparentemente satisfatória, observou-se a presença de patógenos no fermento, sugerindo que parâmetros de higiene aplicados na fazenda precisam ser reavaliados.

A baixa população de microrganismos patogênicos encontrada no pingó provavelmente está relacionada à inibição exercida pela microbiota predominante, composta por BAL (COTTER, HILL, ROSS, 2005; REID, 2008; LORCA, VALDEZ, 2009). A presença de *S. aureus* em algumas amostras de pingó pode estar relacionada à mastite no rebanho e/ou condições inadequadas de higiene durante a ordenha e produção dos queijos (BERGONIER et al., 2014).

Pimentel Filho et al (2005) estudaram o fermento endógeno utilizado na fabricação de QMA no Alto Paranaíba. Das 15 amostras analisadas, 10 apresentaram coliformes totais em até $6,3 \times 10^2$ UFC.mL⁻¹ e 5 apresentaram *E. coli* com contagens de até $5,2 \times 10^2$ UFC.mL⁻¹. Já *S. aureus* só estava ausente em 4 amostras com uma população máxima observada de $1,2 \times 10^3$ UFC.mL⁻¹.

Nóbrega et al. (2008) encontraram no período da seca uma concentração populacional média de coliformes totais de 2,54 log UFC.mL⁻¹ e *E. coli* de 1,60 log UFC.mL⁻¹ no pingo da Serra da Canastra. Já para *S. aureus*, para a mesma época do ano, encontraram contagens médias 1,68 log UFC.mL⁻¹, sendo detectado a presença desse patógeno em 62,5% das amostras analisadas.

Embora não haja um padrão microbiológico para o fermento endógeno utilizado na fabricação dos QMA, pode-se observar que comparadas aos estudos anteriores, as amostras de pingos analisadas apresentaram menor incidência de microrganismos patogênicos, uma vez que *E. coli* não estava presente na menor diluição avaliada nas 20 propriedades estudadas e *S. aureus* em 40% delas. As Características microbiológicas observadas neste estudo sugerem avanços na cadeia produtiva dos QMA ao longo dos anos. Os níveis dos grupos microbianos avaliados neste estudo representam de certa forma, uma contribuição do leite que deu origem ao pingo, assim como do ambiente, da raça do rebanho, do manejo agropastoril e principalmente da aplicação das BPA e BPF nas propriedades que compõem este estudo, sugerindo o importante papel de treinamento de recursos humanos e sua implementação na evolução da qualidade do QMA.

4. CONCLUSÃO

Observou-se diversidade nas características físico-químicas e microbiológicas do pingo entre as 20 propriedades avaliadas na região da Serra da Canastra. O pingo dessa região apresenta uma microbiota predominantemente composta por bactérias do ácido láctico, mas que pode ser carrear coliformes e *S. aureus*, uma vez que é originado da dessoragem de queijo fresco feito com leite cru. A obtenção de leite cru com qualidade microbiológica está relacionada às condições sanitárias de manejo animal e à higiene aplicada ao processo, o que influenciará na qualidade final do QMA. Conclui-se, portanto, que os resultados desse estudo sugerem importante papel de treinamento de BPA e BPF a todos envolvidos na cadeia produtiva dos QMA e a implementação dessas ferramentas visando a evolução contínua da qualidade dos QMA.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- APHA. American Public Health Association. **For the Examination of Dairy Products**. Ed. Robert T. Marshall. 17 Ed. 2004.
- BERGONIER, D.; SOBRAL, D.; FEBLER, A.T.; JACQUET, E.; GILBERT, F.B.; SCHWARZ, S.; TREILLES, M.; BOULOC, P.; POURCEL, C.; VERGNAUD, G. *Staphylococcus aureus* from 152 cases of bovine, ovine and caprine mastitis investigated by Multiple-locus variable number of tandem repeat analysis (MLVA). **Veterinary Research**, 45(1): 97, 2014.
- BETTS, G. D., LINTON, P., BETTERIDGE, R.J. Food spoilage yeasts: effects of pH, NaCl and temperature on growth. **Food Control**, v. 10, p. 27-33, 1999.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº68 de 12 de dezembro de 2006. **Oficializa os métodos analíticos oficiais físico-químicos, para controle de leite e produtos lácteos, em conformidade com o anexo desta Instrução Normativa, determinando que sejam utilizados nos Laboratórios Nacionais Agropecuários**. Diário Oficial da União, Brasília, Seção 1, página 8. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br>>. Acesso em: 10 de abril de 2014.
- COTTER, P.D.; HILL, C.; ROSS, R. P. Bacteriocins: Developing innate immunity for food. **Nature Reviews Microbiology**, v. 3, p. 777-788, 2005.
- DAECHEL, M. A. Antimicrobial substances from lactic acid bacteria for use as food preservatives. **Food Technology**. 43: 164-167, 1989.
- DORES, M. T.; FERREIRA, C. L. L. F. Queijo Minas artesanal, tradição centenária: Ameaças e desafios. **Revista Brasileira de Agropecuária Sustentável (RBAS)**. 2(2): 26-34, 2012.
- FURTADO, M.M. Queijo do Serro: tradição na história do povo mineiro. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, v.35, p.33-36, 1980.
- GOBBETTI, M., LANCIOTTI, R., DE ANGELIS, M., CORBO, M. R., MASSINI, R., FOX, P. F. Study of the temperature pH and NaCl on the peptidase activities of non-starter lactic acid bacteria (NSLAB) by quadratic response surface methodology. **International Dairy Journal**, v.9, p. 865-875, 1999.
- KADARIYA, J.; SMITH, T.C.; THAPALIYA, D. *Staphylococcus aureus* and Staphylococcal Food-Borne Disease: An Ongoing Challenge in Public Health. **Biomed Research International**, p. 1-9, 2014.
- KASHKET, E. R. Bioenergetics of lactic acid bacteria: Cytoplasmic pH and osmotolerance, **FEMS Microbiology Reviews**. 46: 233–244, 1987.
- LANCIOTTI, R.; PATRIGNANI, F.; BAGNOLINI, F.; GUERZONI, M.E.; GARDINI, F. Evaluation of diacetyl antimicrobial activity against *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes* and *Staphylococcus aureus*. **Food Microbiology**, v. 20, n. 5, p. 537–543, 2003.
- LIMA, C.; LIMA, L., CERQUEIRA, M.; FERREIRA, E.; ROSA, C. Bactérias do ácido láctico e leveduras associadas com o queijo-de-minas artesanal produzido na região da Serra do Salitre, Minas Gerais. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**. 61(1): 266-272, 2009.

INSTITUTO MINEIRO DE AGROPECUÁRIA - IMA. Portaria nº 1305, de 30 de abril de 2013. **Estabelece diretrizes para a produção do queijo Minas artesanal.** 2013.

LORCA, G. L.; DE VALDEZ, G. F. *Lactobacillus* Stress Responses. In: *Lactobacillus* Molecular Biology: From Genomics to Probiotics, LJUNGH, Å.; WADSTRÖM, T. (Eds.), **Caister Academic Press**, Norfolk, UK, p. 115–138, 2009.

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

MINAS GERAIS. Assembleia Legislativa do Estado de Minas Gerais. Decreto nº 42.645 de 06 de junho de 2002. **Aprova o Regulamento da lei nº 14.185, de 31 de janeiro de 2002, que dispõe sobre o processo de produção de queijo Minas artesanal.** Belo Horizonte: Assembléia Legislativa do Estado de Minas Gerais, 2002

NÓBREGA, J.E.; FERREIRA, C.L.L.F.; DORES, M.T.; FERREIRA, E.M.; DOMINGO, E.C.; SANTOS, J.P. diferenças sazonais no fermento endógeno utilizado na produção do queijo Minas artesanal, fabricado na Serra da Canastra, Minas Gerais, **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, n. 363, 63, p. 26-30, 2008.

OLIVEIRA, V. J. **Da qualidade e organização da produção ao reconhecimento de região produtora de Queijo Minas Artesanal: a experiência dos produtores da Microrregião Campos das Vertentes-MG.** 2010. 198 p. Tese (Doutorado) da Universidade Federal de Lavras. Lavras, MG 2010.

PIMENTEL FILHO, N.J.; MARTINS, J.M.; CUNHA, L.R.; LOPES, J.P.; FERNANDES, P.E.; FERREIRA, C.L.L.F. Modulação de parâmetros microbiológicos e do pH pelo cloreto de sódio no fermento endógeno utilizado na produção de queijo Minas artesanal do Alto Paranaíba. **Anais do XXII Congresso Nacional de Laticínios**, 2005.

PINTO, M. S. **Efeito da Microbiota Endógena e da Nisina sobre *Listeria* sp. e *Staphylococcus aureus* em queijo Minas artesanal do Serro.** Tese (Doutorado em Ciência e Tecnologia de Alimentos), 71 f. Universidade Federal de Viçosa. Viçosa, 2008.

REID, G. Probiotic *Lactobacilli* for urogenital health in women. **Journal of Clinical Gastroenterology**. (Suppl. 3), 42: 234–236, 2008.

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

ROGELJ, I.; BOGOVIČ-MATIJAŠIČ, B. Bacteriocins of lactic acid Bacteria – Properties, range of inhibitory activity and methods of detection, **Food Technology and Biotechnology**. 32: 171–174, 1994.

SANTOS, A. S. **Queijo minas artesanal da microrregião do Serro-MG: efeito da sazonalidade sobre a microbiota do leite cru e comportamento microbiológico durante a maturação**. 2010. 68 f. Dissertação (Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação Stricto Sensu em Produção Animal). Faculdade de Ciências Agrárias, Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri, Diamantina, 2010.

WELTHAGEN, J. J.; VILJOEN, B. C. The isolation and identification of yeasts obtained during the manufacture and ripening of Cheddar cheese. **Food Microbiology**. 16: 63-73, 1999.

CAPÍTULO 4 – ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DA MICROBIOTA CULTIVÁVEL PREDOMINANTE DO PINGO DA SERRA DA CANASTRA

Resumo

O pingo é o fermento endógeno utilizado na produção de queijo Minas artesanal, que apresenta uma microbiota composta predominantemente composta pelo grupo de BAL que contribuem para a fermentação e maturação desses queijos. O presente estudo objetivou identificar os microrganismos cultiváveis que predominam no pingo da Serra da Canastra e que estão envolvidos no processo fermentativo e de maturação desses queijos, bem como verificar a presença *Staphylococcus aureus* carregado nesse fermento. As bactérias foram isoladas nas placas de maiores diluições após o plaqueamento nos meios MRS e M17 (bactérias láticas) e do ASM (*Staphylococcus* sp.) (capítulo 4). Após a extração do DNA, realizou-se a REP-PCR dos isolados crescidos em meio MRS e M17 com a finalidade de agrupá-los. Além disso, os fenótipos e a morfologia contribuíram para seleção de 47 isolados do meio ASM e 42 dos meios MRS e M17 para serem submetidos à amplificação do gene 16s rDNA sequenciamento. Constatou-se prevalência de bactérias láticas, uma vez que 89% dos isolados do meio ASM foram identificados como *Enterococcus faecalis* e dois isolados como pertencentes do gênero *Staphylococcus*, sendo *Staphylococcus warneri* e *Staphylococcus xylosus*. Dentre os 42 isolados dos meios MRS e M17 enviados para sequenciamento, 15 foram identificados erroneamente, uma vez que a morfologia difere do gênero identificado, e, portanto, será necessária uma identificação definitiva posteriormente. Doze isolados não foram passíveis de identificação devido a presença de “ruídos” dos quais, ao serem excluídos resultaram em sequências pequenas e com baixa similaridade com o banco de dados. Dos 15 isolados restantes, todos pertencem ao gênero *Lactobacillus*, sendo *Lactobacillus plantarum* (13), *L. paracasei* (1) e *L. rhamnosus* (1). Esses resultados reforçam a prevalência de BAL no pingo responsáveis por tornar os QMA seguros para consumo.

1. INTRODUÇÃO

O queijo Minas artesanal (QMA) atualmente é produzido por produtores de sete regiões do estado de Minas Gerais, compreendidas por Araxá, Campo das Vertentes, Canastra, Serra do Salitre, Cerrado, Serro e Triângulo Mineiro

(IMA, 2017). Esses queijos são tradicionalmente produzidos desde o século XVIII, quando imigrantes portugueses da Serra da Estrela em Portugal trouxeram sua cultura e conhecimento para o país (SANTOS et al., 2012).

Os QMA são produzidos com leite cru e utilizam o pingo como fermento endógeno. O pingo é obtido da dessoragem de queijos feitos com leite cru após a enformagem e a salga e sendo adicionado ao leite cru recém-ordenhado para produção do dia seguinte (LIMA et al., 2009; OLIVEIRA, 2010).

As BAL são predominantes no leite cru e no pingo e são responsáveis por direcionar a fermentação do leite com produção de ácido láctico e outros ácidos orgânicos, levando a redução do pH do meio com consequente coagulação da massa. Além disso, esse grupo de bactérias produz compostos antimicrobianos como ácidos orgânicos (KASHKET, 1987; LORCA, VALDEZ, 2009), peróxido de hidrogênio (DAECHEL, 1989; REID, 2008), diacetil (LANCIOTTI et al., 2003) e bacteriocinas (ROGELJ; BOGOVIČ-MATIJAŠIČ, 1994; COTTER et al., 2005), que são capazes de inibir o crescimento de outros microrganismos, incluindo patogênicos.

Além das BAL, microrganismos patogênicos podem estar presentes como contaminantes na matéria-prima, representando uma fonte de preocupação para os órgãos públicos (SOUZA et al., 2009). Dentre eles, destaca-se o patógeno *Staphylococcus aureus*, que pode ser encontrado no leite cru e consequentemente no pingo, sendo responsável pela determinação do período mínimo de maturação dos QMA (DORES et al., 2013; MARTINS et al., 2015), por ser o patógeno que permanece por mais tempo em valores superiores aos limites tolerados pela legislação (2 Log UFC.g^{-1}) (MINAS GERAIS, 2008). A presença desse patógeno no leite pode estar relacionada à mastite bovina (WILSON et al., 1997) ou a condições higiênicas inadequadas, uma vez que alguns indivíduos podem ser portadores assintomáticos dessa bactéria.

Embora *S. aureus* seja encontrado em QMA em populações acima das permitidas por lei (ARAÚJO et al., 2005; BORELLI, 2006; BRANT et al., 2007; SANTOS, 2010; DORES et al., 2013b; SOUZA et al., 2015), não há relatos oficiais de surtos de intoxicações alimentares causados pelo seu consumo, o que pode estar relacionado à atividade fermentativa das BAL e à necessidade de produção de proteínas de superfície por esse patógeno para contornar o estresse ácido, produzidas supostamente na mesma região onde encontram-se os gens produtores de enterotoxinas.

Diante da importância da microbiota endógena para a segurança microbiológica dos QMA, é imprescindível identificar os microrganismos cultiváveis que predominam no pingo da Serra da Canastra e que estão envolvidos no processo fermentativo e de maturação desses queijos, bem como verificar a presença *Staphylococcus aureus* que durante a maturação, permanece por mais tempo até atingir os limites aceitáveis pela legislação vigente. Dessa forma, esse estudo objetivou identificar microrganismos cultiváveis que predominam no pingo da Serra da Canastra e que estão envolvidos no processo fermentativo e de maturação dos QMA, bem como verificar a presença de *Staphylococcus aureus* carregado nesse fermento.

2. METODOLOGIA

2.1. Coleta de amostras

Amostras de aproximadamente 100 mL de pingo foram coletadas em frascos esterilizados em 20 propriedades cadastradas no IMA (Instituto Mineiro de Agropecuária), produtoras de QMA da região da Serra da Canastra, Minas Gerais, cadastradas no IMA (Instituto Mineiro de Agropecuária). Oitenta por cento das propriedades apresentaram condições de higiene adequadas (queijarias e instalações limpas, sem presença de moscas, etc.) e adotavam das boas práticas de fabricação (BPF) desde a ordenha ao produto final. As amostras foram mantidas sob refrigeração e transportadas para o Laboratório de Culturas Láticas do Departamento de Tecnologia de Alimentos da Universidade Federal de Viçosa, onde foram analisadas.

2.2. Isolamento de grupos microbianos do “pingo”

Para isolamento de BAL, procedeu-se ao plaqueamento em profundidade em ágar MRS - De Man, Rogosa e Sharpe, ingredientes (Vetec®, Himedia®, Merck®, Biomedh, Belo Horizonte, Brasil), seguido de incubação a 37 °C, por 48 h e em ágar M17 (ingredientes - Vetec®, Himedia®, Merck®, Biomedh, Belo Horizonte, Brasil), com incubação a 30 °C por 48 h. Para o isolamento foram consideradas as maiores diluições (10^{-5} e 10^{-6}), das quais foram coletadas 5 colônias de cada amostra em cada um dos meios. A seleção foi feita com base em diferenças de morfologia das colônias (cor, tamanho), totalizando 200 isolados. Os isolados alvo foram cocos ou bacilos gram-positivos e catalase negativos.

Para isolar espécies do gênero *Staphylococcus* utilizou-se Ágar Sal Manitol (ASM, Kasvi®, Biomedh, Belo Horizonte, Brasil). Utilizou-se plaqueamento em profundidade das amostras, seguindo-se incubação a 37 °C por 48 h. Para os isolamentos foram consideradas as placas com maiores diluições (10^{-1}), sendo coletadas 5 colônias (quando presentes) de cada amostra. No ágar ASM, buscou-se isolar colônias amarelas rodeadas por halos amarelos, representativas de *S. aureus*. Quando colônias amarelas não estavam presentes, foram coletadas aleatoriamente, colônias com outras características (CHAPMAN, 1945).

Todos os isolados foram submetidos à coloração de Gram (DOWNES, ITO, 2001) e teste de catalase (HOLDEMAN et al., 1987). As culturas com mais de um tipo morfológico foram estriadas, reisoladas e submetidas a uma nova coloração de Gram. Após o processo de purificação, os isolados foram estocados a - 80 °C em caldo MRS (BAL) ou BHI (*Staphylococcus* spp.) contendo 20% (v/v) de glicerol (SPENCER, SPENCER, 1996) até o momento das análises.

2.3. Extração do DNA

A extração do DNA dos isolados de BAL e de *Staphylococcus* spp. foi realizada utilizando-se kit Wizard® Genomic DNA Purification (Promega A1125).

Inicialmente, 1,0 mL de solução contendo cada um dos isolados ativos foi transferida para microtubos e centrifugados a 15.000 x g por 3 min (Centrifuge 5804 R). O sobrenadante foi descartado e o precipitado utilizado para a extração do DNA, com ressuspensão em 480 µL de tampão EDTA (50 mM e pH = 8) e posterior adição de 120 µL de lisozima (10 mg/mL), enzima responsável por promover a lise celular, seguido de incubação a 37 °C/ 1 h. As etapas subsequentes foram realizadas conforme orientações do fabricante e o DNA extraído foi ressuspendido em 50 µL de solução de hidratação presente no kit. A quantificação do DNA foi realizada em espectrofotômetro a 260 – 280 nm (NanoDrop spectrophotometer – Thermo Scientific®). Após quantificação e ajustes, as soluções foram estocadas a -20 °C.

2.4. REP-PCR

Devido a possibilidade de vários isolados pertencerem à mesma espécie, os isolados de BAL foram agrupados por meio de REP-PCR utilizando-se o primer (GTG)₅ (5'-GTGGTGGTGGTGGTG-3'). Todas as reações de PCR apresentaram volume final de 25 µL, utilizando-se Go Taq Master Mix

(Promega®), água pura para PCR (Promega®), 50 pMol do e 1 µL do DNA da amostra na concentração de 80 ng/µL.

As condições de reação de PCR utilizada foram: 94 °C por 2 min para abertura inicial das fitas, 35 ciclos de desnaturação a 94 °C por 45 s, anelamento a 46 °C por 45 s e extensão a 72 °C por 100 s e extensão final de 72 °C por 10 min.

Os fragmentos obtidos foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1 % (m/V) por 3 h a uma voltagem de 90 V em tampão TBE (Tris/Borato/EDTA, pH 8,0). As bandas resultantes foram coradas com brometo de etídio (10mg/mL) e visualizadas em transiluminador LPIX (Loccus Biotecnologia, São Paulo, SP, Brasil). Os padrões de bandas foram analisados utilizando-se o programa Bionumerics 7.6.1 (Applied Maths, Kortrijk, Belgium), a partir dos quais calculou-se a similaridade utilizando-se a correlação de Pearson. Os dendogramas foram construídos por meio do método Unweighted Pair Group Method with Arithmetic (UPGMA) (VERSALOVIC et al., 1994; GEVERS; HUYS; SWINGS, 2001; DAL BELLO et al., 2010).

2.5. Seleção dos isolados para identificação

Com base na morfologia foram selecionados 47 isolados obtidos do meio ASM (bactérias gram-positivas, catalase positivas e fermentadoras de manitol, fenótipos presuntivos do gênero *Staphylococcus*). Utilizando os agrupamentos obtidos na REP-PCR, as características morfológicas e os resultados de antagonismo, foram selecionados 42 isolados obtidos dos meios MRS e M17. Foram selecionados cocos ou bacilos gram-positivos catalase negativos, características relacionadas ao grupo das BAL.

2.6. Amplificação do gene 16S rDNA dos isolados selecionados

O DNA extraído dos isolados bacterianos foi submetido a reação de amplificação utilizando-se os primers universais P027 (5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3') e 1492R (5'-TACCTTGTTACGACTT-3'), visando amplificar o DNA bacteriano entre as posições 27 e 1492 da região 16S do rDNA, gerando fragmentos de aproximadamente 1500 pb (OLIVEIRA et al., 2013). As misturas de amplificação foram padronizadas para 50 µL de reação e feitas utilizando tampão *GoTaq® Gren Master Mix*.

A amplificação dos genes de bactérias lácticas foi realizada nas seguintes condições: desnaturação inicial a 94 °C por 4 min, seguida de 35 ciclos de desnaturação a 94 °C por 1 min, anelamento a 55 °C por 1 min, extensão por 2 min a 72 °C e extensão final durante 7 minutos a 72 °C. Já para o DNA extraído de isolados de *Staphylococcus* spp. o termociclo utilizado foi: desnaturação inicial a 95 °C por 5 min, seguida de 40 ciclos de desnaturação a 95 °C por 30 s, anelamento a 55 °C por 30 s, extensão por 2 min a 74 °C e extensão final durante 5 min a 74 °C. Os produtos da PCR foram estocadas a – 20 °C até o momento de sua utilização (OLIVEIRA et al., 2013).

Os produtos da reação da PCR foram separados por meio de eletroforese em gel de agarose 1,0 % (m/v), com tampão TBE 0,5 X (Tris Borato EDTA 10 X) a uma voltagem de 100 V. As bandas resultantes foram coradas com brometo de etídio (10mg/mL) e os perfis foram analisados em transiluminador. Após confirmação da amplificação e geração de um fragmento de 1500 pb, os fragmentos foram enviados para empresa Macrogen Inc. (Seoul, Korea), onde foram purificados e sequenciados utilizando os mesmos *primers*.

2.7. Análise das sequências

Regiões das sequências com qualidade inferior a 25 na escala Phred foram aparadas e as regiões remanescentes foram alinhadas para obtenção da sequência consenso utilizando o programa Geneious Trial version 10.0.7 (KEARSE et al., 2012). As sequências obtidas foram alinhadas com sequências de genes 16S rRNA presentes no banco de dados do GenBank do National Center for Biotechnology Information (NCBI) utilizando-se o software BLAST (<https://submit.ncbi.nlm.nih.gov/subs/genbank/>).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Características fenotípicas e identificação de isolados em meio ASM

Visando isolar estirpes de *Staphylococcus* spp. das amostras de pingos coletadas e estudar a sensibilidade destes isolados às BAL presentes nesse fermento endógeno, utilizou-se um meio diferencial, classicamente utilizado para isolamento de *S. aureus*, o ágar sal manitol (ASM). As colônias coletadas foram, preferencialmente, as amarelas com halos amarelos, características de *S. aureus*. Entretanto, na ausência de tais colônias, foram coletadas também

outras, de forma aleatória, que poderiam ser associadas a *Staphylococcus* coagulase negativa (CHAPMAN, 1945). As características dos isolados em agar ASM estão indicadas estão descritas no Quadro 1.

Quadro 1 – Morfologia, atividade de catalase e fermentação de manitol dos isolados originados em meio Ágar Sal Manitol (ASM).

Produtor	Colônia				
	1	2	3	4	5
1					
2					
3					
4	-	-	-	-	-
5					
6					
7					
8					
9					
10					
11					
12					
13					
14					
15					
16					
17					
18					
19					
20					

* Não houve crescimento de colônias na menor diluição do produtor 4 nesse meio.

■ - Coco catalase positiva fermentador do manitol; ■ - Coco catalase positiva não fermentador de manitol; ▨ - Coco catalase negativa fermentador de manitol

Um total de 95 isolados, 67 (70%) apresentaram características fenotípicas potenciais da espécie *S. aureus*, apresentando-se como cocos gram-positivos, catalase positivos e fermentadores de manitol. Os cocos gram-positivos que não fermentaram o manitol (20 isolados) poderiam ser espécies de *Staphylococcus* ssp. coagulase negativa, enquanto os cocos catalase negativos fermentadores de manitol (8 isolados) de *Enterococcus faecalis*, que podem crescer no ASM devido a capacidade de tolerar concentrações elevadas de NaCl (FISHER, PHILLIPS, 2009) e por ter a capacidade de utilizar o manitol como fonte de carbono (QUILOAN, VU, CARVALHO, 2012).

A presença de coagulase é considerada um fator de patogenicidade em microrganismos, pois essa enzima é capaz de converter o fibrinogênio em fibrina e provocar a deposição dessa proteína em torno do microrganismo, dificultando o seu reconhecimento e fagocitose pelas células do sistema imune (SANTOS et al., 2007).

Até a década de 80, o grupo *Staphylococcus* coagulase negativo (SCN) era considerado não patogênico por ser um integrante comensal da microbiota de humanos e animais (KLOOS, BANNERMAN, 1994). Entretanto, espécies desse grupo têm sido apontadas como responsáveis por infecções hospitalares (CUNHA et al., 2006; MAZZARIOL et al., 2012; SADER et al., 2016), além de terem sido detectados em seu genoma fatores de virulência comumente identificados em *S. aureus* como enterotoxinas (PARK et al., 2011; NANOUKON et al., 2017), determinantes de resistência a antibióticos (PODKOWIK et al., 2012; NANOUKON et al., 2017), entre outros. Estirpes de SCN que apresentam fatores de virulência em seu genoma já foram isoladas em queijos não maturados (NUNES et al., 2016), revelando o potencial patogênico das bactérias deste grupo. Não há, até o nosso conhecimento, estudos similares envolvendo QMA maturados.

Dentre as espécies pertencentes ao grupo SCP, o gênero *S. aureus* é o mais conhecido devido à sua patogenicidade. A presença desse microrganismo no leite geralmente está associada a condições de higiene inadequadas e à ocorrência de mastite bovina no rebanho (AARESTRUP et al., 1995). Em queijos não maturados feitos com leite cru, esse patógeno muitas vezes é encontrado em contagens acima de 10^5 UFC.g⁻¹, um fato preocupante para os órgãos públicos, visto que a partir dessa concentração toxinas podem ser produzidas e causar a intoxicação por ingestão do alimento contaminado (AKINEDEN et al., 2008).

Dos 67 isolados em meio ASM consideradas potenciais estirpes de *S. aureus*, 47 deles foram selecionados para que as sequências fossem comparadas com as sequências depositadas no banco de dados GenBank. As espécies identificadas foram *Staphylococcus warneri*, *Staphylococcus xylosus*, e *Enterococcus faecalis* (Tabela 1). Dos 47 isolados, somente 3 não apresentaram similaridade significativa com o banco de dados.

Tabela 1 - Espécies isoladas do pingo utilizado na fabricação do QMA da Serra da Canastra em meio ASM (Agar Sal Manitol) e prevalência de identificação.

Gênero	Espécies identificadas	Prevalência
<i>Staphylococcus</i>	<i>Staphylococcus warneri</i>	1
	<i>Staphylococcus xylosus</i>	1
<i>Enterococcus</i>	<i>Enterococcus faecalis</i>	42
Sem identificação	-	3
Total		47

Cerca de 89% dos isolados foram identificados como *E. faecalis*. Embora o meio Agar Sal Manitol seja considerado diferencial para o isolamento de *S. aureus* (AKINEDEN et al., 2008; RIEU et al., 2008; ALHASHIMI, AHMED, MUSTAFA, 2017), *E. faecalis* também tem a capacidade de crescer em altas concentrações de sal (6,5% m/v) (FISHER, PHILLIPS, 2009) e de utilizar o manitol como fonte de carbono (QUILOAN, VU, CARVALHO, 2012), alterando o pH do meio com consequente mudança na cor do ASM de vermelho para amarelo. As elevadas concentrações de *E. faecalis* no pingo pode ter suprimido o crescimento de *S. aureus* no meio, resultando no baixo número de isolamento de estirpes desse gênero. Isso indica que o pingo não deve ser considerado fonte importante de contaminação pela possibilidade de carrear o gênero *Enterococcus* que compete e desfavorece o crescimento dos *Staphylococcus*, incluindo a espécie *S. aureus* que não foi isolada em nenhuma das amostras das 20 propriedades estudadas.

No presente estudo, somente 2 espécies de *Staphylococcus* foram identificadas, *S. xylosus* e *S. warneri*, ambas isoladas na amostra do pingo do produtor 1. Por serem halotolerantes, essas estirpes foram capazes de resistir ao teor de sal do pingo e do meio de isolamento. As estirpes isoladas não apresentam atividade para a coagulase e são consideradas comensais que podem ser encontradas na pele e nas membranas mucosas de mamíferos e aves (NAGASE et al., 2002), além de estarem naturalmente presentes na carne crua e no leite (BAUTISTA et al. 1988; TALON, LEROY-SÉTRIN, FADDA, 2002). Embora a maioria das cepas de *Staphylococcus* coagulase negativas sejam comensais, algumas podem causar infecções oportunistas em humanos (KOKSAL, YASAR, SAMASTI, 2009) e animais (MIEDZOBRODZKI et al., 1989).

Apesar de 8 das 20 amostras de pingo ocorreram contagens de *S. aureus* (Capítulo 3), no meio de cultura utilizado não ocorreu o isolamento. Porém, esses

resultados confirmam a prevalência de bactérias do ácido lático nesse fermento, uma vez que quase 90% dos isolados foram identificados como *Enterococcus* spp., gênero pertencente ao grupo de BAL.

O gênero *Enterococcus* é composto por 56 espécies e 2 subespécies (EUZÉBY, 2017a). Essas espécies estão associadas a diversos habitats, como solo, plantas, água, silagem, alimentos e trato gastrointestinal de humanos e animais (PORTENIER, WALTIMO, HAAPASALO, 2003). A presença de *Enterococcus* é comum em queijos e tem sido isolado em QMA de diversas regiões como Serra do Salitre (LIMA et al., 2009), Serra da Canastra (RESENDE et al., 2011), Campo das Vertentes (CASTRO, 2015) e Araxá (SILVA, 2016). Sua presença em alimentos já foi considerada indicativo de condições higiênicas sanitárias inadequadas durante a manipulação dos alimentos, porém, devido a sua ubiquidade, essa relação foi abolida (GIRAFFA, 2002). No entanto, espécies do gênero podem causar infecções em animais e humanos, e algumas estirpes, apresentarem resistência a diversos antibióticos (HAMMET, HASSAN, SHIMAMOTO, 2015) e são carreadoras de fatores de virulência tais como adesinas, invasinas e hemolisinas (FRANZ et al., 2011). Nos queijos, *Enterococcus* desempenha papel importante na maturação, contribuindo com a textura e flavor pela alta atividade lipolítica e proteolítica (RENYE et al., 2011), acumulando ainda compostos aromáticos voláteis oriundos do metabolismo do citrato, como diacetil, acetaldeído e acetoína (BULUT et al., 2005).

Castro (2015) ao isolar BAL utilizando os meio MRS e M17 a partir de QMA de Campos das Vertentes, observou predominância de *E. faecalis* no leite, no fermento endógeno e no queijo. As mesmas espécies foram encontradas, embora no presente estudo o meio de isolamento tenha sido o ASM.

3.2. Características fenotípicas e identificação dos isolados de Bactérias do ácido lático

Os meios MRS e M17 são comumente utilizados para isolamento e cultivo de *Lactobacillus* spp. e *Lactococcus/Streptococcus/Enterococcus* spp. respectivamente. Esses gêneros bacterianos pertencem ao grupo de BAL caracterizadas como bacilos ou cocos gram-positivos catalase negativas, não formadores de esporos e que geralmente são anaeróbios ou anaeróbios facultativos (BERGEY, HOLT, 1994).

Visando conhecer a morfologia (cocos, diplococos, bacilos, diplobacilo, etc) dos isolados, utilizou-se lâminas coradas pela técnica de coloração de Gram observadas ao microscópio.

Dentre os 200 microrganismos isolados em meio MRS e M17 (100 em cada meio), 144 (72%) apresentaram-se como cocos ou bacilos gram-positivos catalase negativos, características inerentes ao grupo de BAL (Quadro 1). Vinte oito dos isolados apresentaram características morfológicas não conformes com o estipulado neste estudo.

Quadro 1 – Características de Gram e atividade de catalase de microrganismos predominantes isolados nos meios MRS* e M17** de amostras do fermento endógeno utilizado na produção do QMA da Serra da Canastra.

Produtor	Isolados em meio MRS					Isolados em meio M17				
	Colônia					Colônia				
	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5
1	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
2	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
3	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
4	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
5	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
6	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
7	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
8	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
9	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
10	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
11	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
12	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
13	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
14	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
15	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
16	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
17	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
18	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
19	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
20	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■

■ CPN – Coco gram-positivo e catalase negativo; □ BNN – Bacilo gram-negativo e catalase negativo; □ BPN – Bacilo gram-positivo e catalase negativo; □ BPP – Bacilo gram-positivo e catalase positivo; ■ CNN – Coco gram-negativo e catalase negativo; □ CPP - Coco gram-positivo e catalase positivo (n=200 isolados)

*MRS (DE MAN, ROGOSA, SHARPE, 1960); ** M17 (TERZAGHI, SANDINE, 1975)

Os meios MRS e M17 têm sido frequentemente empregados no isolamento de bactérias do ácido láctico em diversos tipos de queijos (SHANKAR, DAVIES, 1977; DOLCI et al., 2008; BARBIERI et al., 2012; DOMINGOS-LOPES et al., 2017). No entanto, no presente estudo, a diversidade nas características morfológicas dos isolados obtidos nos meios empregados corroboram com a baixa seletividade desses meios comerciais. Gêneros comumente isolados a partir do meio M17 incluem *Enterococcus*, *Lactococcus* (DOMINGOS-LOPES et al., 2017); *Lactobacillus* (DOLCI et al., 2008), *Streptococcus* (ANDRIGHETTO et

al., 2002), além de *Staphylococcus* spp. (BARBIERI et al., 2012). Já em MRS têm sido descritas estirpes de *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Enterococcus*, *Streptococcus*, *Leuconostoc* (DOLCI et al., 2008) e *Pediococcus* (BARBIERI et al., 2012).

Os 200 isolados bacterianos obtidos dos meios MRS e M17 foram agrupados por meio de técnica de REP-PCR, resultando em 79 padrões distintos, considerando-se uma similaridade acima de 90% (Anexo 2). Partindo de isolados representantes dos 79 padrões, foram selecionados 42 isolados com características inerentes a BAL.

Dos 42 isolados enviados para sequenciamento, 12 não foram passíveis de identificação devido a presença de “ruídos”, dos quais ao serem excluídos, resultaram em sequências pequenas e com em baixa similaridade com o banco de dados. Outros 15 isolados (5 do meio MRS e 10 do M17) apresentaram a morfologia de cocos, ou seja, divergente do gênero ao qual foi identificado e, portanto, será necessário que estes sejam submetidos a identificação definitiva posteriormente. Os 15 isolados restantes foram identificados definitivamente (morfologia é condizente com a do gênero identificado) como pertencentes ao gênero *Lactobacillus*, sendo *L. plantarum* (13), *L. paracasei* (1) e *L. rhamnosus* (1) como mostrado na Tabela 2.

Tabela 2 – Bactérias do ácido lático (gênero/espécie) isoladas do pinga utilizado na fabricação do QMA da Serra da Canastra, MG isoladas em ágar MRS* e M17**.

Gênero	Espécies identificadas	Prevalência
<i>Lactobacillus</i>	<i>Lactobacillus paracasei</i> (MRS)	1
	<i>Lactobacillus rhamnosus</i> (M17)	1
	<i>Lactobacillus plantarum</i> (MRS e M17)	13
Identificação a ser confirmada	-	15
Sem identificação	-	12
Total		42

*MRS (DE MAN, ROGOSA, SHARPE, 1960); ** M17 (TERZAGHI, SANDINE, 1975)

Todas as bactérias isoladas nos meios MRS e M17 foram identificadas como pertencentes ao gênero *Lactobacillus*. Embora o agar M17 seja comumente utilizado para crescimento de espécies do gênero *Lactococcus* e

Streptococcus devido à variedade de nutrientes nele contida, não se esperava que o pingo carresse grande número de espécies desses gêneros na forma viável, uma vez que *Streptococcus* são sensíveis a pequenas concentrações de sal e espécies de *Lactococcus* têm sua tolerância variável. Considerando que 50% das amostras não identificadas apresentam a morfologia de cocos, possivelmente esses isolados pertençam ao gênero *Enterococcus*, por ser um gênero conhecidamente resistente ao sal nas concentrações encontradas no pingo.

Ao associar o dendograma resultante da REP-PCR aos resultados obtidos na identificação do gene 16S rRNA, fica ainda mais evidente a prevalência da espécie *L. plantarum* nos pingos obtidos nas diferentes propriedades como mostrado na Tabela 3.

Tabela 3 – Identificação e agrupamento das bactérias lácticas isoladas nos meios MRS e M17

Número	UFVCC	Identificação dos isolados	Nº de acesso ao Genbank	% Identidade	Isolados agrupados
P1.4 MRS	0114	<i>Lactobacillus plantarum</i>	MF425548	99	P1.4* MRS P13.5 MRS
P2.1 MRS	0115	<i>Lactobacillus paracasei</i>	MF425551	100	P2.1* MRS P2.2 MRS
P7.3 MRS	0116	<i>Lactobacillus paracasei</i>	MF425549	100	P6.3 MRS P6.4 MRS P7.3 MRS
P8.5 MRS	0117	<i>Lactobacillus plantarum</i>	MF425550	100	P7.5 MRS P8.5 MRS P10.2 MRS P10.4 MRS P14.5 MRS P16.3 MRS P4.5 M17 P9.1 M17 P10.4 M17 P13.2 M17

Número	UFVCC	Identificação dos isolados	Nº de acesso ao Genbank	% Identidade	Isolados agrupados
					P13.4 M17 P14.5 M17
P9.5 MRS	0118	<i>Lactobacillus plantarum</i>	<u>MF425553</u>	100	P9.2 MRS P9.3 MRS P9.4 MRS P9.5 MRS P10.1 MRS
P10.5 MRS	0119	<i>Lactobacillus plantarum</i>	<u>MF425552</u>	100	P10.3 MRS P10.5* MRS P11.1 MRS P11.2 MRS
P11.3 MRS	0120	<i>Lactobacillus plantarum</i>	<u>MF431211</u>	100	P11.3 MRS P11.4 MRS P11.5 MRS P12.1 MRS
P12.4 MRS	0121	<i>Lactobacillus plantarum</i>	<u>MF425556</u>	100	P12.4 MRS
P13.4 MRS	0122	<i>Lactobacillus plantarum</i>	<u>MF425554</u>	100	P12.5 MRS P13.3 MRS P13.4* MRS P14.1 MRS
P15.4 MRS	0123	<i>Lactobacillus plantarum</i>	<u>MF425556</u>	100	P15.4 MRS P15.5 MRS
P16.5 MRS	0124	<i>Lactobacillus plantarum</i>	<u>MF425557</u>	100	P16.5 MRS P17.1 MRS P17.2 MRS
P17.4 MRS	0125	<i>Lactobacillus plantarum</i>	<u>MF425558</u>	100	P17.4 MRS P17.5 MRS
P18.4 MRS	0126	<i>Lactobacillus plantarum</i>	<u>MF425559</u>	100	P16.4 MRS P18.3 MRS P18.4 MRS

Número	UFVCC	Identificação dos isolados	Nº de acesso ao Genbank	% Identidade	Isolados agrupados
P19.3 MRS	0127	<i>Lactobacillus plantarum</i>	<u>MF425560</u>	100	P18.5 MRS P19.1 MRS P19.2 MRS P19.3 MRS P19.4 MRS P19.5 MRS P20,1 MRS P20,2* MRS P20,3 MRS P20,4 MRS P20,5 MRS
P20.2 MRS	0128	<i>Lactobacillus plantarum</i>	<u>MF425562</u>	100	
P2.4 M17	0129	<i>Lactobacillus plantarum</i>	<u>MF425585</u>	100	P1.2 M17 P1.3 M17 P1.5 M17 P2.4* M17
P3.1 M17	0130	<i>Lactobacillus plantarum</i>	<u>MF425561</u>	100	P3.1* M17
P9.3 M17	0135	<i>Lactobacillus plantarum</i>	<u>MF425565</u>	100	P9.3* M17
P4.1 M17	0131	<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	<u>MF425580</u>	100	P4.1 M17
P5.2 M17	0132	<i>Lactobacillus plantarum</i>	<u>MF425563</u>	100	P5.2* M17 P5.3 M17 P7.4 M17 P8.1 M17 P8.3 M17 P9.2 M17 P9.4 M17 P9.5 M17
P7.5 M17	0133	<i>Lactobacillus plantarum</i>	<u>MF431206</u>	100	P7.5* M17
P8.5 M17	0134	<i>Lactobacillus plantarum</i>	<u>MF425564</u>	100	P8.5* M17 P10.1 M17
P10.3 M17	0136	<i>Lactobacillus plantarum</i>	<u>MF425566</u>	100	P10.3 M17

Número	UFVCC	Identificação dos isolados	Nº de acesso ao Genbank	% Identidade	Isolados agrupados
P11.5 M17	0137	<i>Lactobacillus plantarum</i>	<u>MF425581</u>	100	P11.1
					M17
					P11.2
					M17
					P11.3
					M17
					P11.4
					M17
					P11.5*
					M17
P12.4 M17	0138	<i>Lactobacillus plantarum</i>	<u>MF425582</u>	100	P12.1
					M17
					P12.2
					M17
					P12.3
					M17
					P12.4*
					M17
					P12.5
					M17
					P13.1
					M17
					P13.3
					M17
					P13.5
					M17
					P14.1
					M17
P15.1 M17	0139	<i>Lactobacillus plantarum</i>	<u>MF425584</u>	100	P14.2
					M17
					P14.3
					M17
					P15.1*
					M17
					P15.2
					M17
					P15.3
					M17
P16.3 M17	0140	<i>Lactobacillus plantarum</i>	<u>MF425567</u>	100	P15.4
					M17
					P15.5
					M17
					P16.1
					M17
					P16.2
					M17
					P16.3*
					M17
P17.4 M17	0141		<u>MF425568</u>	100	P16.4
					M17
					P16.5
					M17
					P17.1
					M17
					P17.2
					M17
					P17.3
					M17
					P17.4*
					M17

Número	UFVCC	Identificação dos isolados	Nº de acesso ao Genbank	% Identidade	Isolados agrupados
		<i>Lactobacillus plantarum</i>			
P18.4 M17	0142	<i>Lactobacillus plantarum</i>	<u>MF425569</u>	100	P18.4 M17
					P19.1 M17
					P19.4 M17
P20.1 M17	0143	<i>Lactobacillus plantarum</i>	<u>MF425583</u>	99	P20.1 M17
					P20.3 M17

*Isolados caracterizados como cocos, passíveis de confirmação da identificação
UFVCC – Coleção de culturas da Universidade Federal de Viçosa

O gênero *Lactobacillus* compreende 223 espécies e 29 subespécies (EUZÉBY, 2017b). Sua presença nos queijos artesanais está relacionada à maturação, devido à produção de compostos aromatizantes voláteis que contribuem para o seu perfil sensorial (SGARBI et al., 2013). *L. rhamnosus*, *L. casei* e *L. plantarum* são consideradas espécies desejadas nos queijos devido a suas características sensoriais e pelo papel probiótico das mesmas (HOLZAPFEL et al., 2001).

Lactobacillus plantarum é uma espécie pertencente ao grupo de BAL, anaeróbia facultativa, mesofílica, heterofermentativa e que apresenta um melhor desenvolvimento na presença de 4,0 a 6,0% m/v de NaCl, em valores de pH entre 4 e 9. Essa espécie já foi isolada de diferentes nichos ecológicos como produtos de origem vegetal (BRINGEL et al., 2005), leite e derivados (BRUNO, CARVALHO, 2009), produtos cárneos (SCHILINGER et al., 1987) e trato intestinal de humanos e animais (JATOBÁ et al., 2008; COSTA et al., 2012). Estirpes de *L. plantarum* isoladas de QMA da Serra da Canastra demonstraram elevado potencial probiótico *in vitro* por sua capacidade de tolerar altas concentrações de sais biliares e ácidos e de inibir bactérias patogênicas causadoras de intoxicações e infecções alimentares, como *L. monocytogenes* e *S. aureus* (ANDRADE, 2012; OLIVEIRA, 2012). Além disso, a produção de bacteriocinas por essa espécie já foi relatada (ENNAHAR et al., 1996; MILLS et al., 2011). Dessa forma, a presença de *L. plantarum* no queijo pode contribuir tanto para o desenvolvimento de sabor como para segurança microbiológica dos QMA (OUADGHIRI et al., 2005).

A espécie *Lactobacillus rhamnosus* é anaeróbia facultativa, com temperatura ótima entre 30 – 40°C. É comum em derivados de leite, principalmente em queijos artesanais, e também no trato gastrointestinal e vaginal de humanos (DORON et al., 2005; LEÃO et al., 2015). Essa espécie apresenta potencial probiótico por resistir ao ácido e à bile, assim como pela capacidade de colonização que contribui para modulação do sistema imune do hospedeiro (DORON et al., 2005).

Utilizando o meio MRS para isolamento de bactérias do QMA de Araxá, Luiz et al. (2017) encontraram os gêneros *Lactobacillus*, *Enterococcus*, *Pediococcus* e *Lactococcus*. *Lactobacillus* spp. foi prevalente (72% dos isolados), sendo *L. plantarum* e *L. rhamnosus* as espécies mais frequentemente encontradas. Ao isolar bactérias em amostras de QMA das regiões de Araxá, Serra do Salitre, Serro, Campo das vertentes e Canastra em meio MRS, Perin et al. (2017) identificaram a presença dos gêneros *Lactobacillus*, *Enterococcus*, *Weisella* e *Lactococcus*. Em todas as variedades de queijos estudadas *Lactobacillus* spp. foi prevalente, sendo o único gênero identificado nos queijos da Serra do Salitre e Araxá. Além disso, no queijo da Serra da Canastra, 17 dos 28 isolados foram identificados como *L. plantarum*. Embora no presente estudo o isolamento tenha sido realizado a partir do pingô, os resultados corroboram os trabalhos citados em que foi observada em todas as avaliações a prevalência de *L. plantarum* em queijos.

4. CONCLUSÃO

Este estudo confirmou a prevalência de BAL nas diferentes amostras de pingô, com predominância de *L. plantarum* e *E. faecalis*. Nos QMA, esses microrganismos auxiliam no processo fermentativo, na maturação, no desenvolvimento de *flavor* característico, além de produzir compostos antimicrobianos capazes de antagonizar microrganismos indesejáveis, contribuindo para que esses queijos se tornem seguros para consumo após período adequado de maturação.

Observou-se ainda que o fermento endógeno utilizado na fabricação do QMA produzido na serra da Canastra não deve ser considerado fonte de contaminação por *S aureus*, possivelmente pelo fato de o gênero *Enterococcus* ser capaz de tolerar elevadas concentrações de NaCl (>6,5%) e sua

predominância nesse fermento pode ser considerada uma proteção em detrimento à proliferação de espécies do gênero *Staphylococcus*, incluindo a espécie *S aureus*. Informações científicas, dessa natureza, também corroboram o saber fazer tradicional tão importante na perpetuação dos produtos artesanais. O pingó direciona a maturação do QMA e pode ser um protetor para segurança do produto, por agir desde o início do processo de fabricação dos QMA, direcionando as reações fermentativas que ali ocorrem.

Portanto, a produção do QMA sem o pingó ou a sua substituição pelas “ralas”, como tem ocorrido após alterações físicas implementadas, por exemplo a retirada da banca e outros utensílios de madeira, como forma de legalizar o processo de fabricação, devem ser vistos como uma deterioração do processo, pois tais práticas levam a desapropriação do saber e precisam com urgência, de uma revisão pelas autoridades que as impõem. O fermento endógeno, pingó, faz parte do QMA que foi registrado como um bem nacional, e como tal, deve ser mantido como parte integrante da receita original, ou seja, do processo de fabricação do QMA tradicional.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AARESTRUP, F.M.; WEGENER, H.C.; ROSDAHL, V.T. Evaluation of phenotypic and genotypic methods for epidemiological typing of *Staphylococcus aureus* isolates from bovine mastitis in Denmark. **Veterinary Microbiology**, v. 45, p. 139–150, 1995.
- AKINEDEN, O.; HASSAN, A.A.; SCHNEIDER, E.; USLEBER, E. Enterotoxigenic properties of *Staphylococcus aureus* isolated from goats' milk. **International Journal of Food Microbiology**, v. 124, n.2, p. 211-216, 2008.
- ALHASHIMI, H.M.M.; AHMED, M.M.; MUSTAFA, J.M. Nasal carriage of enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* among food handlers in Kerbala city, **Karbala International Journal of Modern Science**, v.3, n.2, p.69-74, 2017.
- ANDRADE, C. R. G. **Propriedades probióticas in vitro de *Lactobacillus* spp. isolados de queijos Minas artesanais da Serra da Canastra – MG**. 2012. 57f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.
- ANDRIGHETTO, C.; BORNEY, F.; BARMAZ, A.; STEFANON, B.; LOMBARDI, A. Genetic diversity of *Streptococcus thermophilus* strains isolated from Italian traditional cheeses. **International Dairy Journal**, v. 12, p. 141–144, 2002.
- ARAÚJO, R. A. B. et al. Avaliação de *Staphylococcus aureus* em queijo Minas artesanal produzido na região de Araxá. In: ENCONTRO NACIONAL DE ANALISTAS DE ALIMENTOS, 14, Goiânia – GO, 2005. **Anais**. Goiânia, 2005.
- BARBIERI, E.; SCHIAVANO, G.F.; DE SANTI, M.; VALLORANI, L.; CASADEI, L.; GUESCINI, M.; GIOACCHINI, A.G.; RINALDI, L.; STOCCHI, V.; BRANDI, G. Bacterial diversity of traditional Fossa (pit) cheese and its ripening environment. **International Dairy Journal**, v. 23, n. 1, p. 62–67, 2012.
- BAUTISTA, L.; GAYA, P.; MEDINA, M.; NUNEZ, M. A Quantitative Study of Enterotoxin Production by Sheep Milk *Staphylococci*. **Applied and Environmental Microbiology**, p. 566-569, 1988.
- BERGEY, D.H.; HOLT, J.G. **Bergey's manual of determinative bacteriology**. 9. ed. Lippincott Williams & Wilkins, 1994.
- BORELLI, B. M. Enterotoxigenic *Staphylococcus* spp. and other microbial contaminants during production of Canastra cheese, Brazil. **Brazilian journal of Microbiology**. 37: 545-550, 2006.
- BRANT, L. M. F.; FONSECA, L. M.; SILVA, M. C. C. Avaliação da qualidade microbiológica do queijo-de-minas artesanal do Serro-MG. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 59, n. 6, p. 1570-1574, 2007.
- BRINGEL, F.; CASTIONI, A.; OLUKOYA, D.K.; FELIS, G.E.; TORRIANI, S.; DEELLAGIO, S. *Lactobacillus plantarum* subsp. argenteratensis subsp. nov., isolated from vegetable matrices. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, 55: 1629–1634, 2005.
- BRUNO, L. M.; CARVALHO, J. D. G. **Microbiota Láctica de Queijos Artesanais**. IN: Documentos / Embrapa Agroindústria Tropical. Fortaleza, 2009. 30p. Disponível em: <https://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/bitstream/doc/748514/1/Doc124.pdf>. Acessado em: 04 de novembro de 2017.

BULUT, C.; GUNES, H.; OKUKLU, B. et al. Homofermentative lactic acid bacteria of a traditional cheese, Comlek peyniri from Cappadocia region. **Journal of Dairy Research**, v.72, p.19-24, 2005.

CASTRO, R. D. **Queijo Minas artesanal fresco de produtores não cadastrados da mesorregião de campo das vertentes – mg: qualidade microbiológica e físico-química em diferentes épocas do ano**. 2015. 89-90 f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG.

CHAPMAN, G.H. The significance of sodium chloride in studies of staphylococci. **Journal of Bacteriology**, v. 50, p. 201-203, 1945.

COSTA, G.N.; UGUIMOTO, H.H.; MIGLIORANZA, L.H.S.; GÓMEZ, R.J.H.C. Atividade antimicrobiana de *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* frente a microrganismos patogênicos “*in vitro*”. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 33(5), p. 1839-1846, 2012.

COTTER, P.D.; HILL, C.; ROSS, R. P. Bacteriocins: Developing innate immunity for food. **Nature Reviews Microbiology**. 3: 777-788, 2005.

CUNHA, M.L.R.S.; RUGOLO, L.M.S.S.; LOPES, C.A.M. Study of virulence factors in coagulase-negative staphylococci isolated from newborns. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 101, p. 661–668, 2006.

DAECHEL, M. A. Antimicrobial substances from lactic acid bacteria for use as food preservatives. **Food Technology**. 43: 164-167, 1989.

DAL BELLO, B., RANTSIOU, K., BELLIO, A., ZEPPA, G., AMBROSOLI, R., CIVERA, T., COCOLIN, L. Microbial ecology of artisanal products from North West of Italy and antimicrobial activity of the autochthonous populations. **LWT - Food Science and Technology**, v. 43, p. 1151-1159, 2010.

DE MAN, J.C.; ROGOSA, M.; SHARPE, E.M. A medium for the cultivation of *Lactobacilli*. **Journal Applied Microbiology**, v. 23, p. 130-135, 1960.

DOLCI, P.; ALESSANDRIA, V.; ZEPPA, G.; RANTSIOU, K.; COCOLIN, L. Microbiological characterization of artisanal Raschera PDO cheese: Analysis of its indigenous lactic acid bacteria. **Food Microbiology**, v. 25, p. 392–399, 2008.

DOMINGOS-LOPES, M.F.P.; STANTON, C.; ROSS, P.R.; DAPKEVICIUS, M.L.E.; SILVA, C.C.G. Genetic diversity, safety and technological characterization of lactic acid bacteria isolated from artisanal Pico cheese. **Food Microbiology**, v. 63, p. 178-190, 2017.

DORES, M. T.; NOBREGA, J. E.; FERREIRA, C. L. L. F. Ripening at room temperature warrants microbiological safety in the Brazilian Artisan Canastra Cheese. **Ciência e Tecnologia de Alimentos** (Impresso). 33: 180-185, 2013.

DORES, M. T.; NOBREGA, J. E.; FERREIRA, C. L. L.F. Room temperature aging to guarantee microbiological safety of Brazilian artisan Canastra cheese. **Revista Ciência e Tecnologia de Alimentos**. 33(1): 180-185, 2013b.

DORON, S.; SNYDMAN, D. R.; GORBACH, S. L. *Lactobacillus* GG: bacteriology and clinical applications. **Gastroenterology Clinics of North America**, Maryland Heights, v.34, p.483-498, 2005.

DOWNES, F.P.; ITO, K. (ed.). **Compendium of methods for the microbiological examination of foods**, 4th ed. American Public Health Association, Washington, D.C. 2001.

ENNAHAR, S.; AOUDE-WERNER, D.; SOROKINE, O. et al. Production of pediocin AcH by *Lactobacillus plantarum* WHE 92 isolated from cheese. **Applied and Environmental Microbiology**, v.62, n.12, p. 4381–4387, 1996.

EUZÉBY, J.P. List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature. Genus *Enterococcus*. Disponível em: <http://www.bacterio.net/enterococcus.html>. Acessado em: 01 de maio de 2017a.

EUZÉBY, J.P. List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature. Genus *Lactobacillus*. Disponível em: <http://www.bacterio.net/lactobacillus.html>. Acessado em: 09 de maio de 2017b.

FISHER, K.; PHILLIPS, C. The ecology, epidemiology and virulence of *Enterococcus*. **Microbiology**, v. 155, p. 1749-1757, 2009

FRANZ, C.M.A.P. et al. Enterococci as probiotics and their implications in food safety. **International Journal of Food Microbiology**. V. 151, n. 2, p. 125–140, 2011.

GEVERS, D., HUYS, G., & SWINGS, J. Applicability of rep-PCR fingerprinting for identification of *Lactobacillus* species. **FEMS Microbiology Letters**, v. 205, p. 31-36, 2001.

GIRAFFA, G. Enterococci from foods. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 26, n. 2, p. 163-171, 2002.

HAMMET, A.M.; HASSAN, H.A.; SHIMAMOTO, T. Prevalence, antibiotic resistance and virulence of *Enterococcus* spp. in Egyptian fresh raw milk cheese. **Food Control**, 50, 815–820, 2015.

HOLDEMAN, L.V.; CATO, E.P.; MOORE, W.E.C. **Anaerobe Laboratory Manual**. Virginia Polytechnic Institute and State University, Blacksburg, USA, 908 167p., 1987.

HOLZAPFEL, W.H.; HABERER, P.; GEISEN, R. et al. Taxonomy and important features of probiotic microorganisms in food and nutrition. **American Journal of Clinical Nutrition**, n. 73, suppl., p.365S-373S, 2001.

INSTITUTO MINEIRO DE AGROPECUÁRIA – IMA. **Queijo Minas Artesanal**. Disponível em: <http://www.ima.mg.gov.br/queijo-minas-artesanal>. Acessado em: 10 de março de 2017a.

JATOBÁ, A.; VIEIRA, F.N.; BUGLIONE, C.; SIVA, B.C.; MORIÑO, J.L.P.; JERÔNIMO, G.T.; DOTTA, G.; MARTINS, M.L. Utilização de bactérias ácido-láticas isoladas do trato intestinal de tilápia-do-nilo como probiótico. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.43(9), p. 1201-1207, 2008.

KASHKET, E.R. Bioenergetics of lactic acid bacteria: Cytoplasmic pH and osmotolerance, **FEMS Microbiology Reviews**, v. 46, p. 233–244, 1987.

KEARSE, M. et al. Geneious Basic: An integrated and extendable desktop software platform for the organization and analysis of sequence data. **Bioinformatics**, v. 28, n. 12, p. 1647–1649, 2012.

KLOOS, W.E.; BANNERMAN, T.L. Update on Clinical Significance of Coagulase-Negative Staphylococci. **Clinical Microbiology Reviews**, p. 117-140, 1994.

KOKSAL, F.; YASAR, H.; SAMASTI, M. Antibiotic resistance patterns of coagulase-negative staphylococcus strains isolated from blood cultures of septicemic patients in Turkey. **Microbiology Research**, 164:404–410, 2009.

LANCIOTTI, R.; PATRIGNANI, F.; BAGNOLINI, F.; GUERZONI, M.E.; GARDINI, F. Evaluation of diacetyl antimicrobial activity against *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes* and *Staphylococcus aureus*. **Food Microbiology**, v. 20, n. 5, p. 537–543, 2003.

LEÃO, M.V.P.; SILVA, C.R.G.; SANTOS, S.S.F. et al. *Lactobacillus rhamnosus* pode alterar a virulência de *Candida albicans*. **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia**, v.37, p.417-420, 2015.

LIMA, C. D. L. C.; LIMA, L. A.; CERQUEIRA, M. M. O. P. et al. Bactérias do ácido láctico e leveduras associadas com o queijo-de-minas artesanal produzido na região da Serra do Salitre, Minas Gerais. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 61, n. 1, p. 266-272. 2009.

LORCA, G. L.; DE VALDEZ, G. F. *Lactobacillus* Stress Responses. In: *Lactobacillus* Molecular Biology: From Genomics to Probiotics, LJUNGH, Å.; WADSTRÖM, T. (Eds.), **Caister Academic Press**, Norfolk, UK, p. 115–138, 2009.

LUIZ, L.M.P.; CASTRO, R.D.; SANDES, S.H.C.; SILVA, J.G.; OLIVEIRA, L.G.; SALES, G.A.; NUNES, A.C.; SOUZA, M.R. Isolation and identification of lactic acid bacteria from Brazilian Minas artisanal cheese. **Journal of Food**, v. 15, n. 1, p. 125–128, 2017.

MARTINS, J. M.; GALINARI, E.; PIMENTEL-FILHO, N. J.; RIBEIRO JR, J. I.; FURTADO, M. M.; FERREIRA, C.L.L.F. Determining the minimum ripening time of artisanal Minas cheese, a traditional Brazilian cheese. **Brazilian Journal of Microbiology** (Online). 46: 219-230, 2015.

MAZZARIOL, A.; LO CASCIO, G.; KOCSIS, E.; MACCACARO, L.; FONTANA, R.; CORNAGLIA, G. Outbreak of linezolid-resistant *Staphylococcus haemolyticus* in an Italian intensive care unit. **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases**, v. 31, p. 523–527, 2012.

MIEDZOBRODZKI J, NAIDU AS, WATTS JL, CIBOROWSKI P, PALM K, WADSTRÖM T. Effect of milk on fibronectin and collagen type I binding to *Staphylococcus aureus* and coagulase-negative staphylococci isolated from bovine mastitis. **Journal of Clinical Microbiology**, 27:540–544, 1989.

MILLS, S.; SERRANO, L. M.; GRIFFIN, C. et al. Inhibitory activity of *Lactobacillus plantarum* LMG P-26358 against *Listeria innocua* when used as an adjunct starter in the manufacture of cheese. **Microbial Cell Factories**, v.10, suppl, 1, 2011.

MINAS GERAIS. Assembleia Legislativa do Estado de Minas Gerais. Decreto nº 44.864 de 01 de agosto de 2008. **Altera o regulamento da lei nº14.185 de 31 de janeiro de 2002, que dispõe sobre o processo de produção do queijo Minas artesanal**. Belo Horizonte: Assembléia Legislativa do Estado de Minas Gerais, 2008.

NAGASE, N.; SASAKI, A.; YAMASHITA, K.; SHIMIZU, A.; WAKITA, Y.; KITAI, S.; KAWANO, J. Isolation and species distribution of staphylococci from animal and human skin. **Journal of Veterinary Medical Science**, 64:245-250, 2002.

NANOUKON, C.; ARGEMI, X.; SOGBO, F.; OREKAN, J.; KELLER, D.; AFFOLABI, D.; SCHRAM, F.; RIEGEL, P.; BABA-MOUSSA, L.; PRÉSEVOST, G. Pathogenic features of clinically significant coagulase-negative staphylococci in hospital and community infections in Benin. **International Journal of Medical Microbiology**, v. 307, p. 75–82, 2017.

NUNES, R.S.C.; SOUZA, C.P.; PEREIRA, K.S.; DEL AGUILA, E.M.; PASCHOALIN, V.M.F. Identification and molecular phylogeny of coagulase-negative staphylococci isolates from Minas Frescal cheese in southeastern Brazil: Superantigenic toxin production and antibiotic resistance. **Journal of Dairy Science**, v. 99, n. 4, 2641–2653, 2016.

OLIVEIRA, D. L. S. **Staphylococcus spp. isolados de queijo artesanal da Serra da Canastra: identificação bioquímica e molecular, detecção de genes para produção de toxinas, susceptibilidade a antimicrobianos e atividade antagonista in vitro frente a Lactobacillus spp.** 2012. 47f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG.

OLIVEIRA, M. N. V et al. Endophytic microbial diversity in coffee cherries of Coffee arabica from southeastern Brazil. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 59, n. 4, p.221–30, 2013.

OLIVEIRA, V. J. **Da qualidade e organização da produção ao reconhecimento de região produtora de Queijo Minas Artesanal: a experiência dos produtores da Microrregião Campos das Vertentes-MG.** 2010. 198 p. Tese (Doutorado) da Universidade Federal de Lavras. Lavras, MG 2010.

OUADGHIRI, M.; AMAR, M.; VANCANNEYT, M. et al. Biodiversity of lactic acid bacteria in Moroccan soft White cheese (Jben). **FEMS Microbiology Letters**, v. 251, n. 2, p. 267-271, 2005.

PARK, J.Y.; FOX, L.K.; SEO, K.S.; McGUIRE, M.A.; PARK, Y.H.; RURANGIRWA, F.R.; SISCHIO, W.M.; BOHACHI, G.A. Detection of classical and newly described staphylococcal superantigen genes in coagulase-negative staphylococci isolated from bovine intramammary infections. **Veterinary Microbiology**, v. 147, n. 1-2, 149-54, 2011.

PERIN, L.M.; SARDARO, M.L.S.; NERO, L.A.; NEVIANI, E.; GATTI, M. Bacterial ecology of artisanal Minas cheeses assessed by culture-dependent and -independent methods. **Food Microbiology**, v. 65, p. 160–169, 2017

PODKOWIK, M.; BYSTRON, J.; BANIA, J. Genotypes, antibiotic resistance, and virulence factors of staphylococci from ready-to-eat food. **Foodborne Pathogens and Disease**, v. 9, p. 91–93, 2012.

PORTENIER, I.; WALTIMO, T.M.T.; HAAPASALO, M. Enterococcus faecalis—the root canal survivor and ‘star’ in post-treatment disease. **Endodontic Topics**, n. 6, p. 135–159, 2003.

QUILOAN, M.L.G.; VU, J.; CARVALHO, J. *Enterococcus faecalis* can be distinguished from *Enterococcus faecium* via differential susceptibility to antibiotics and growth and fermentation characteristics on mannitol salt agar. **Frontiers in Biology**, v. 7, n.2, p. 167–177, 2012.

REID, G. Probiotic *lactobacilli* for urogenital health in women. **Journal of Clinical Gastroenterology**. (Suppl. 3), 42: 234–236, 2008.

RENYE JR, J.A.; SOMKUTI, G.A.; VAN HEKKEN, D.L.; PRIETOT, G.V.M. Short communication: Characterization of microflora in Mexican Chihuahua cheese. **Journal of Dairy Science**, 94, 3311–3315, 2011.

RESENDE, M. F. S.; COSTA, H. H. S.; ANDRADE, E. H. P. et al. Queijo de minas artesanal da Serra da Canastra: influência da altitude das queijarias nas populações de bactérias ácido lácticas. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.63, n.6, p.1567-1573, 2011.

RIEU, A.; LEMAÎTRE, J.P.; GUZZO, J.; PIVETEAU, P. Interactions in dual species biofilms between *Listeria monocytogenes* EGD-e and several strains of *Staphylococcus aureus*. **International Journal of Food Microbiology**, v. 126, n.1-2, p. 76-82, 2008.

ROGELJ, I.; BOGOVIČ-MATIJAŠIČ, B. Bacteriocins of lactic acid Bacteria – Properties, range of inhibitory activity and methods of detection. **Food Technology and Biotechnology**, v. 32, p. 171–174, 1994.

SADER, H.S.; FARRELL, D.J.; FLAMM, R.K.; STREIT, J.M.; MENDES, R.E.; JONES, R.N. Antimicrobial activity of ceftaroline and comparator agents when tested against numerous species of coagulase-negative *Staphylococcus* causing infection in US hospitals. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 85, n. 1, p. 80–84, 2016.

SANTOS, A. S. **Queijo Minas artesanal da microrregião do Serro – MG: efeito da sazonalidade sobre a microbiota do leite cru e comportamento microbiológico durante a maturação**. 2010. 67 p. Dissertação (Pós-graduação em Zootecnia) – Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri, Diamantina, 2010.

SANTOS, A.L.; SANTOS, D.O.; FREITAS, C.C.; FERREIRA, B.L.A.; AFONSO, I.F.; RODRIGUES, C.R.; CASTRO, H.C. *Staphylococcus aureus*: visitando uma cepa de importância hospitalar. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 43, n. 6, p. 413-423, 2007.

SANTOS, J. S.; CRUZ, F. T.; MENASCHE, R. O mineiro, o queijo e os conflitos (nada poéticos) em torno dos alimentos tradicionais produzidos artesanalmente no Brasil. In: **ENCONTRO DA REDE DE ESTUDOS RURAIS: DESENVOLVIMENTO, RURALIDADES E AMBIENTALIZAÇÃO**: Paradigmas e atores em conflito, 5º, 2012, Belém. Conference Paper. UFPA, Belém (PA), 2012, 15p.
Disponível em:
<http://www.redesrurais.org.br/sites/default/files/O%20mineiro,%20o%20queijo%20e%20os%20conflitos%20em%20torno%20dos%20alimentos%20tradicionais%20produzidos%20artesanalmente%20no%20Brasil.pdf>. Acessado em: 05 maio 2014.

SCHILLINGER, U.; LÜCKE, F-K. Identification of lactobacilli from meat and meat products. **Food Microbiology**, 4(3):199-208, 1987.

SGARBI, E.; LAZZI, C.; TABANELLI, G.; GATTI, M.; NEVIANI, E.; GARINI, F. Nonstarter lactic acid bacteria volatiles produced using cheese components. **Journal of Dairy Science**, 7, 4223–4234, 2013.

SHANKAR, P.A.; DAVIES, F.L. Associative bacterial growth in yogurt starters; initial observations on stimulatory factors. **Journal of the Society of Dairy Technology**, v. 30, p. 28–30, 1977.

SILVA, J.G. **Identificação molecular de bactérias ácido lácticas e propriedades probióticas in vitro de *Lactobacillus* spp. isolados de queijo Minas artesanal de Araxá, Minas Gerais**. 2016. 82p. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG.

SOUZA, G.N. et al. Variação da contagem de células somáticas em vacas leiteiras de acordo com patógenos da mastite. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 61, n. 5, p. 1015-1020, 2009.

SOUZA, V.; MELO, P.C.; MEDEIROS, M.I.M.; CONDE, S.O.; NADER FILHO, A. Estirpes de *Staphylococcus aureus* isoladas de queijo Minas artesanal de Araxá. **Ars Veterinaria**, Jaboticabal, SP, v.31, n.1, 019-023, 2015.

SPENCER, J.F.; SPENCER, D.M. Maintenance and culture of yeasts. **Methods in Molecular Biology**, 53:5-15, 1996.

TALON, R.; LEROY-SÉTRIN, S.; FADDA, S. Bacterial starters involved in the quality of fermented meat products, p. 175-191. In F. Toldra (ed.), **Handbook of research advances in quality of meat and meat products**. Research Signpost, Kerala, India, 2002.

TERZAGHI, B.E.; SANDINE, W.E. Improved medium for lactic Streptococci and their bacteriophages. **Journal of Applied Microbiology**, v. 29, n. 6, p.807-813, 1975.

VERSALOVIC, J., SCHNEIDER, M., DE BRUIJN, F.J., LUPSKI, J.R. Genomic fingerprinting of bacteria using repetitive sequence-based polymerase chain reaction. **Methods in Molecular and Cellular Biology**, v. 5, n.1, p.25-40, 1994.

WILSON, D.J.; GONZALEZ, R.N.; DAS, H.H. Bovine mastitis pathogens in New York and Pensilvania: prevalence and effects on somatic cell count and milk production. **Journal of Dairy Science**, v.80, p.2592-2598, 1997.

CAPÍTULO 5 - PAPEL DA MICROBIOTA DO FERMENTO ENDÓGENO (PINGO) UTILIZADO NA FABRICAÇÃO DO QUEIJO CANASTRA NO ANTAGONISMO A PATÓGENOS INDICADORES DE QUALIDADE

Resumo

A microbiota do fermento endógeno utilizado na produção de QMA é composta predominantemente por bactérias pertencentes ao grupo de BAL que durante a fermentação e maturação, produzem metabólitos com capacidade antagonista que são primordiais para o alcance da segurança microbiológica desses queijos no final do seu período de maturação. O objetivo do estudo foi verificar o efeito antagonista de bactérias predominantes do fermento endógeno utilizado na fabricação de queijos produzidos na Serra da Canastra sobre patógenos indicadores de qualidade. As BAL que foram isoladas nos meios MRS e M17 foram avaliadas ainda quanto a produção de diacetil e atividade proteolítica. Os 49 isolados testados apresentaram atividade antagonista sobre os patógenos indicadores. O antagonismo foi atribuído a produção de ácidos orgânicos e a outras substâncias antimicrobianas, possivelmente diacetil e substâncias de natureza proteica, uma vez que 89,9% dos isolados apresentaram atividade proteolítica e 91,8% a capacidade de produzir diacetil. Desta forma, sugere-se um importante papel da microbiota endógena do pingo na qualidade microbiológica final dos queijos, por contribuir no processo de maturação, principal período em que ocorre esse antagonismo. A inibição das BAL exercida sobre microrganismos indicadores de qualidade durante a maturação, é um dos fatores responsáveis para que esses queijos atinjam os limites microbiológicos exigidos por lei, tornando-os seguros para consumo.

1. INTRODUÇÃO

A produção do queijo Minas Artesanal (QMA) é uma atividade que atualmente faz parte da vida econômica de 9445 famílias e que gera anualmente 29.000 toneladas de queijos para o Estado de Minas Gerais (EMATER, 2017). Para fabricação de QMA os produtores utilizam o leite cru combinado com a adição de coalho, sal e de fermento endógeno, também conhecido como “pingo”. O pingo é uma porção do soro colhida na fase final do processo de dessoragem e após a salga dos queijos. Esse fermento endógeno reflete a microbiota do leite

cru utilizado na fabricação do QMA, sendo adicionado ao leite na produção do dia seguinte (LIMA et al., 2009). A microbiota desse fermento contribui para direcionar a fermentação e a maturação desses queijos. Essa receita tradicional está presente em diversas regiões do Estado, com um maior destaque para as regiões do Serro e da Serra da Canastra que, em 2008, teve o modo artesanal de fazer o queijo registrado como patrimônio cultural imaterial pelo Instituto do Patrimônio Histórico e Artístico Nacional (IPHAN) (IPHAN, 2008).

A microbiota do leite, carregada no pingo e consequentemente no queijo, é composta predominantemente por bactérias do ácido láctico (BAL), podendo conter também patógenos contaminantes tais como *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* spp. e *Staphylococcus aureus* (FRANCIOSI et al., 2009). Desses, o que permanece por mais tempo em contagens acima do permitido por lei (10^2 UFC.mL⁻¹) (MINAS GERAIS, 2008) durante a maturação, é a espécie estafilocócica (DORES et al., 2013, MARTINS et al., 2015). Essa espécie está presente no leite/queijo devido a falhas na implementação de técnicas de BPF e BPA. Além disso, faz parte do grupo de microrganismos responsáveis por infecções intra mamárias e o conhecimento das estirpes contribui para o seu rastreamento e identificação de fontes de contaminação (BERGONIER et al., 2014).

Em diversos estudos realizados com QMA produzido em diferentes regiões e em amostras com diversos graus de maturação, foram detectadas contagens de *S. aureus* acima do exigido pela legislação (MINAS GERAIS, 2008), (ARAÚJO et al., 2005; BRANT et al., 2007; BORELLI et al., 2006; DORES et al., 2013a; SOUZA et al., 2015). Paradoxalmente, embora o consumo do QMA seja elevado, registros de notificação de doenças ou surtos envolvendo o desse alimento são raros. Essa constatação pode estar relacionada à atividade metabólica da microbiota diversificada presente no QMA feito com leite cru onde BAL predominam e ao seu conhecido efeito antagonista a patógenos (HAINES, HARMON, 1973; HARRIS et al, 1989; REID, 2008; LORCA, VALDEZ, 2009). Bactérias do ácido láctico são acidificantes, tornando o pH do ambiente impróprio para o crescimento de patógenos. Além do efeito antagônico exercido pela presença de ácidos orgânicos (KASHKET, 1987; LORCA, VALDEZ, 2009), outras substâncias produzidas pela microbiota endógena tais como peróxido de hidrogênio (DAECHEL, 1989; REID, 2008), peptídeos bioativos e bacteriocinas (ROGELJ; BOGOVIČ-MATIJAŠIČ, 1994; COTTER et al., 2005; DE VUYST,

LEROY, 2007) e substâncias aromáticas como diacetil e acetaldeído (LANCIOTTI et al., 2003; SUSKOVIC et al., 2010), podem estar contribuindo para o antagonismo que ocorre durante o processo de maturação, responsável pela segurança microbiológica do QMA atingida durante esse processo (DORES et al, 2013b; MARTINS et al, 2015).

Atualmente os períodos mínimos de maturação exigidos para que o QMA seja considerado seguro para consumo é de 17 dias para os produzidos no Serro e de 22 dias para os da Serra da Canastra, Cerrado, Araxá e Campo das Vertentes (IMA, 2013). Dessa forma, é importante conhecer a contribuição das BAL na segurança dos QMA e descrever os possíveis mecanismos de proteção que desempenham nessa matriz alimentar.

O objetivo do estudo foi verificar o efeito antagonista da microbiota endógena predominante no fermento endógeno utilizado na fabricação de queijos produzidos na Serra da Canastra sobre patógenos indicadores de qualidade, além de avaliar a produção de diacetil e atividade proteolítica desses isolados.

2. METODOLOGIA

2.1. Teste de atividade antagonista

Com base na morfologia (cocos), identificação e agrupamento dos isolados pela REP-PCR, foram selecionados 41 isolados do meio MRS e 8 do meio M17 (Capítulo 4) para avaliar a capacidade antagonistas das BAL frente a patógenos indicadores. Para isso foram utilizados os seguintes patógenos referência: *E. coli* ATCC 11229, *S. aureus* ATCC 13565, *L. monocytogenes* ATCC 15313 e *S. Enteritidis* ATCC 13076, gentilmente doados pela Fundação Osvaldo Cruz e mantidos a – 80 °C em caldo BHI contendo 20% (v/v) de glicerol. Antes de iniciar os testes, os patógenos foram ativados, por três vezes consecutivas, em caldo BHI (Acumedia®, Biomedh, Belo Horizonte, Brasil) e os isolados, em caldo MRS.

O ensaio da atividade antagonista foi realizado conforme descrito por Fleming et al. (1975), utilizando-se a técnica de toque em superfície sólida (*spot-on-lawn-assay*). Os isolados do meio MRS e do M17 após ativação foram inoculados em placas contendo ágar MRS e incubados a 37 e 30 °C respectivamente. Após a formação de colônias visíveis, foram vertidos 10 mL de

BHI semissólido (0,7% m/v de ágar) contendo 10^6 UFC.mL⁻¹ de um dos patógenos referência sobre as placas. Após a solidificação do meio, as placas foram incubadas a 37 °C por 24 h. Em seguida os diâmetros (mm) dos halos de inibição foram medidos com auxílio de um paquímetro.

Para análise do efeito de ácidos na inibição, o teste de antagonismo foi realizado utilizando-se meios tamponados com bicarbonato de sódio (2 g.L⁻¹) (TOURÉ et al., 2003), seguindo-se o mesmo procedimento descrito anteriormente.

2.2. Teste de produção de diacetil

A produção de diacetil pelos isolados obtidos nos meios MRS e M17 foi verificada conforme descrito por Hammer e Babel (1957), em que foi adicionado a um tubo de ensaio contendo 2,5 mL da cultura ativa, 2,5 mL de NaOH 10N e 1 mL de solução de creatina 1% (m/v), seguido de agitação em vortex por 10 min. A alteração da cor do meio para rósea-avermelhado foi indicativo de resultado positivo para a presença de acetoína e/ou diacetil de acordo com o princípio do método. Para controle positivo utilizou-se a estirpe *Lactococcus lactis* subs. *lactis* biovar *diacetylactis* obtida do banco de culturas do Laboratório de Culturas Láticas do Departamento de Tecnologia de Alimentos da Universidade Federal de Viçosa.

2.3. Teste de atividade proteolítica dos isolados de BAL

Os isolados dos meios MRS e M17, previamente ativados foram semeados por micro gota em placas contendo Ágar Padrão para Contagem – PCA (BD®, Biomedh, Belo Horizonte, Brasil) acrescido de leite desnatado reconstituído (LDR) a 10% (m/v) esterilizado, modificado conforme descrito por Collins, Lyne (1976). O LDR foi preparado e esterilizado separadamente e, posteriormente adicionado ao PCA. Foram considerados proteolíticos os isolados em que halos foram observados ao redor das colônias.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os isolados obtidos do pingo a partir dos meios MRS e M17 foram avaliados quanto à capacidade antagônica (diâmetro dos halos em mm, Figura 1) em meio MRS e em MRS tamponado (Figura 2 e 3).



Figura 1 - Formação de halo (diâmetro em mm) no teste de antagonismo de isolados do fermento endógeno utilizado na fabricação do QMA da Serra da Canastra

Os 41 isolados do meio MRS avaliados quanto à capacidade antagônica apresentaram halos com diâmetro variando de <2 a 60 mm. Grande parte dos isolados em meio MRS apresentou atividade antagonista (halos maiores de 2 mm de diâmetro) sobre os patógenos indicadores, porém quando o meio foi tamponado um maior percentual (17% em média) de isolados não apresentaram atividade antagonista contra os diferentes patógenos indicadores (Figura 2).

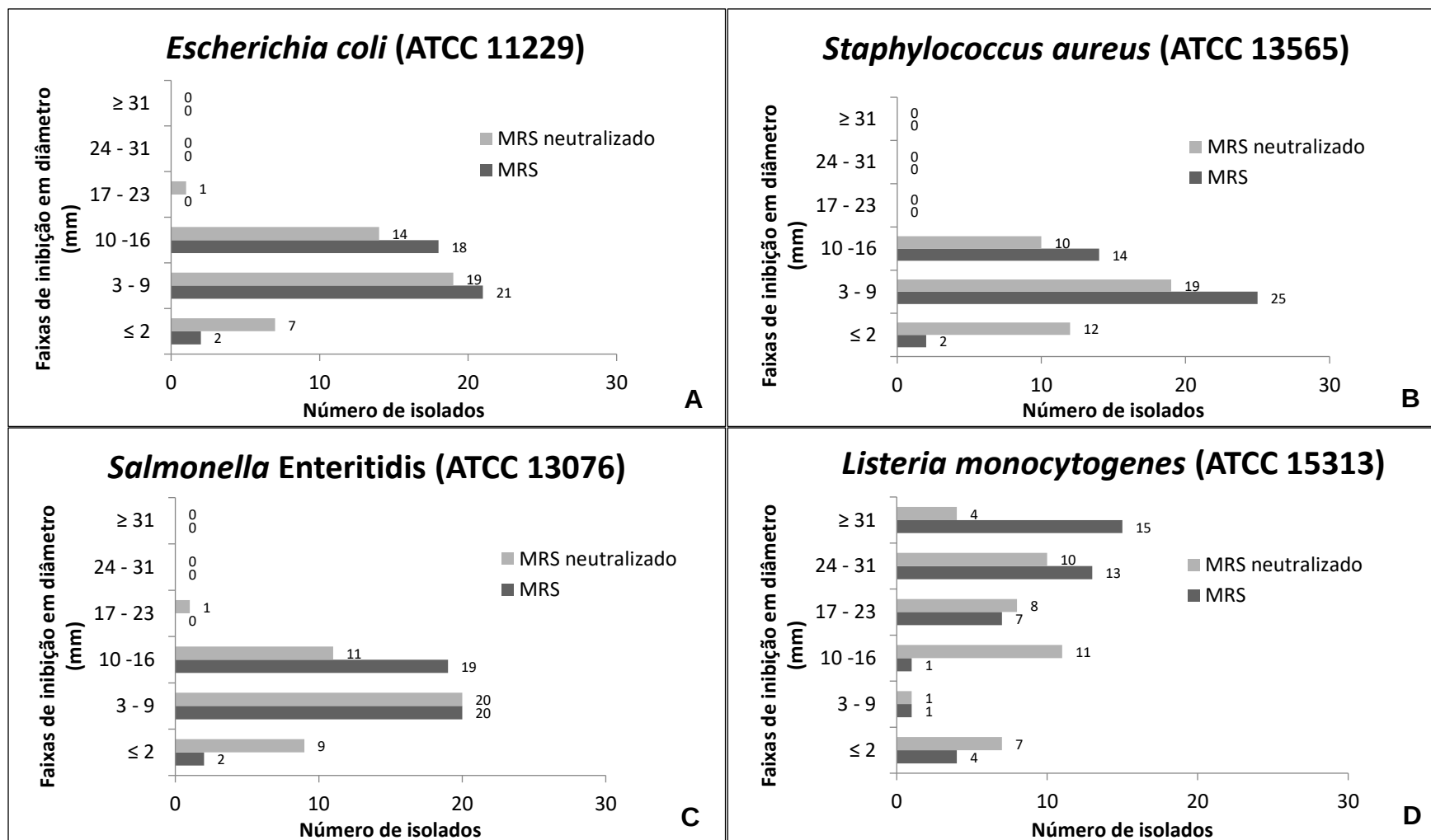


Figura 2 –Antagonismo (diâmetro dos halos de inibição em mm) em ágar MRS e MRS tamponado de microrganismos predominantes em fermentos endógenos utilizados na produção de QMA da Serra da Canastra isolados em meio MRS (DE MAN, ROGOSA, SHARPE, 1960) contra patógenos indicadores (n=41 isolados).

O antagonismo exercido pelos isolados do ágar MRS sobre *E. coli*, *S. aureus* e *S. Enteritidis* foram semelhantes (Figura 2A, 2B, 2C), com o tamanho dos halos na faixa de 3 a 16 mm de diâmetro por parte de 95% dos isolados. O antagonismo a *L. monocytogenes* apresentou maior variação na inibição, em que foram formados halos com diâmetros na faixa de 3 a mais de 31mm (Figura 2D).

Dos 41 isolados estudados quanto a capacidade antagonista, 3 foram identificados como *Lactobacillus paracasei* e 38 como *Lactobacillus plantarum*. Embora os números de isolados sejam muito discrepantes, é possível observar que os isolados de *L. paracasei* foram mais eficientes na inibição de *L. monocytogenes* (Figura 3A), enquanto *L. plantarum* apresentaram diâmetro de halos maiores contra *S. Enteritidis* (Figura 3B).

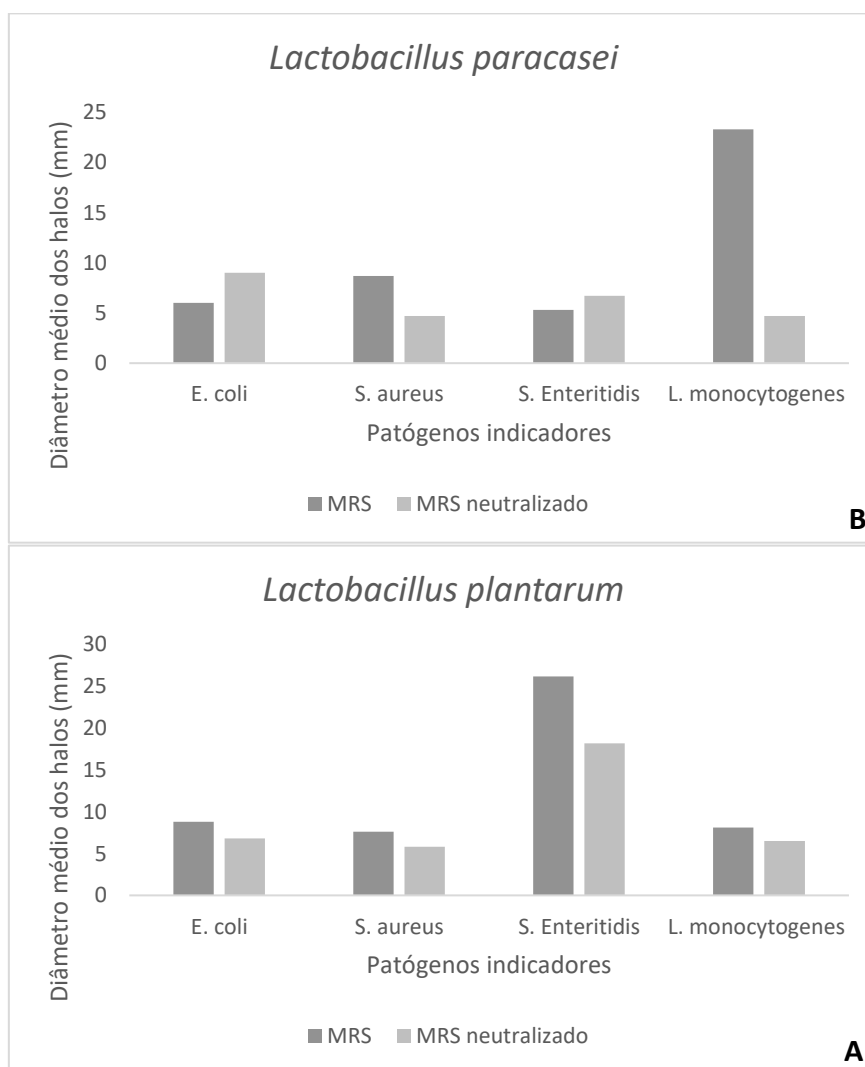


Figura 3 –Antagonismo (diâmetro médio dos halos de inibição em mm) em ágar MRS e MRS tamponado de *Lactobacillus paracasei* e *Lactobacillus plantarum* isolados em meio MRS a partir de fermentos endógenos utilizados na produção de QMA da Serra da Canastra contra patógenos indicadores (n=41 isolados).

Os isolados em meio M17 foram mais eficientes na inibição dos patógenos (Figura 4), o que ficou evidenciado pelo maior diâmetro médio dos halos de inibição.

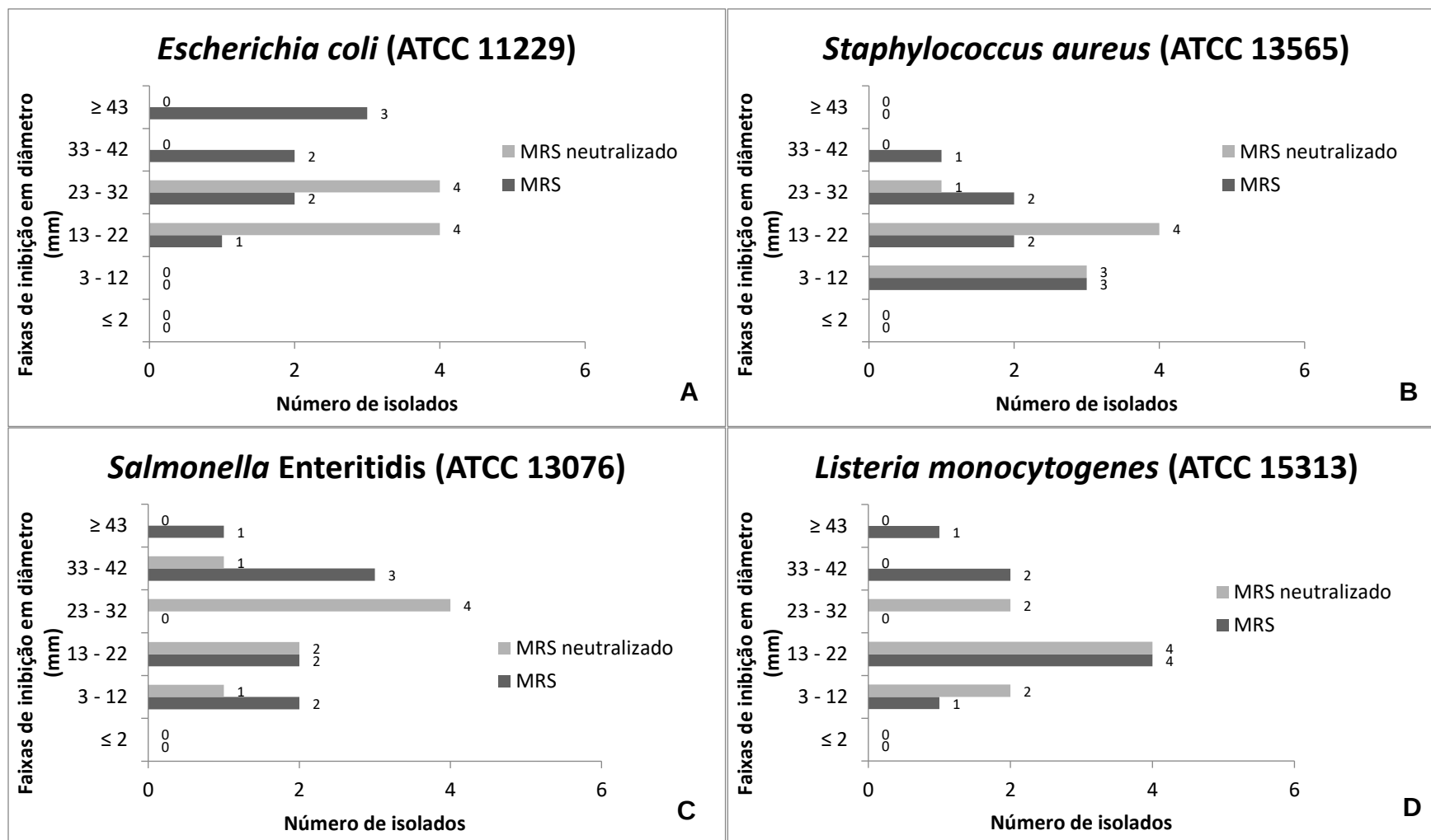


Figura 4 –Antagonismo (diâmetro dos halos de inibição em mm) em ágar MRS e MRS tamponado de microrganismos predominantes em fermentos endógenos utilizados na produção de QMA da Serra da Canastra isolados em meio M17 (TERZAGHI, SANDINE, 1975) contra patógenos indicadores (n=8 isolados).

Todos os isolados em M17 estudados antagonizaram os 4 patógenos indicadores com diferentes graus de eficiência (Figura 4A, 4B, 4C e 4D). Observa-se que *E. coli*, foi o patógeno indicador mais sensível, uma vez que todos formaram halos com diâmetros superiores a 13 mm e 37,5% apresentou halos superiores a 43 mm de diâmetro (Figura 4A).

Foram avaliados 8 isolados no meio M17 quanto a capacidade antagônica, do qual 1 foi identificado como *Lactobacillus rhamnosus* e 7 como *Lactobacillus plantarum*. Os halos de inibição produzidos por *L. rhamnosus* apresentaram diâmetros maiores que o diâmetro médio dos isolados de *L. plantarum* (Figura 5A e 5B) e foi mais eficiente na inibição *E. coli* e *S. Enteritidis* (Figura 4A) enquanto os isolados de *L. plantarum* foram mais eficientes na inibição de *E. coli* (Figura 5B). *L. monocytogenes* foi o patógeno mais sensível aos metabólitos produzido por *L. rhamnosus*, tendo apresentado halo com diâmetro menor (Figura 5A).

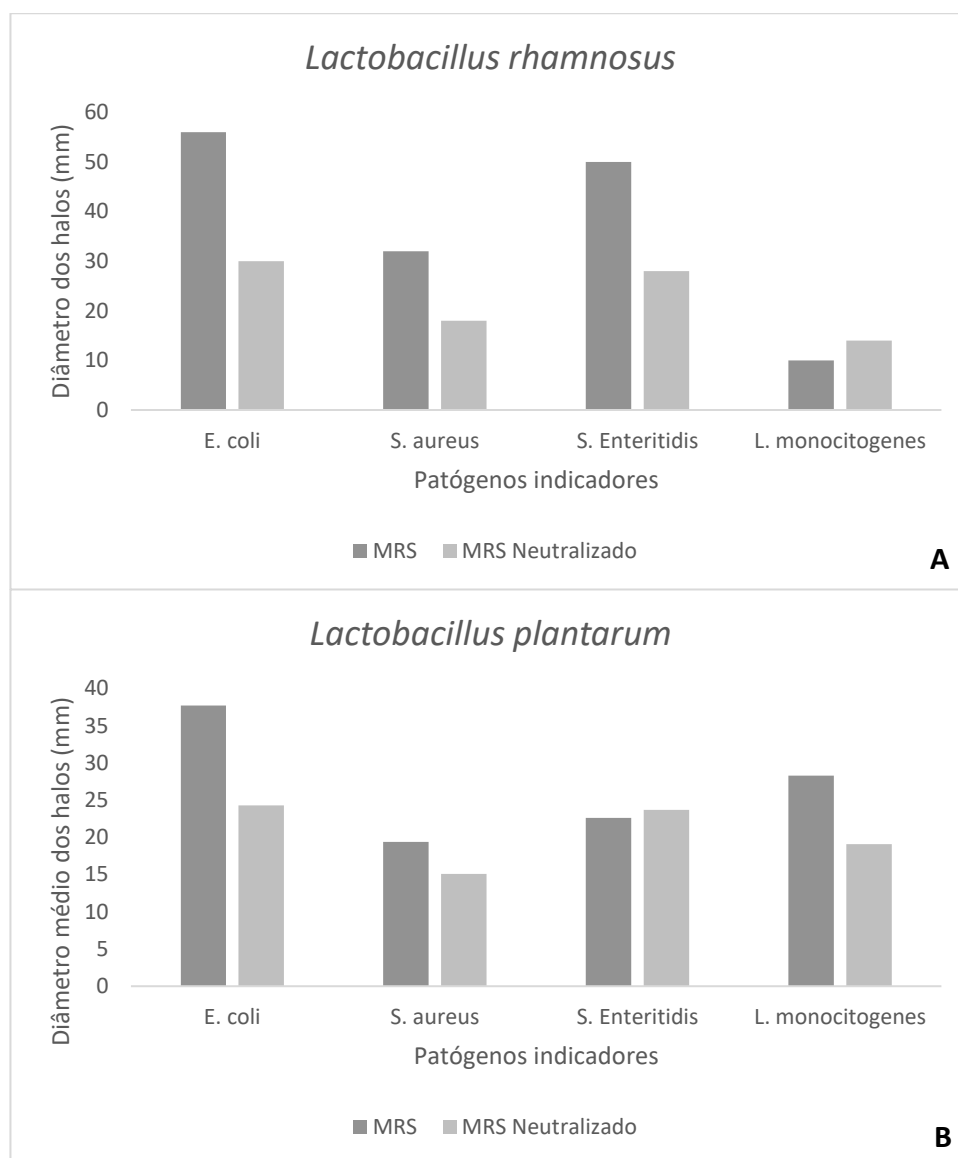


Figura 5 –Antagonismo (diâmetro médio dos halos de inibição em mm) em ágar MRS e MRS tamponado de *Lactobacillus rhamnosus* e *Lactobacillus plantarum* isolados em meio M17 a partir de fermentos endógenos utilizados na produção de QMA da Serra da Canastra contra patógenos indicadores (n=8 isolados).

A presença de bactérias do gênero *Lactobacillus* nos queijos artesanais está relacionada à maturação, devido à produção de compostos aromatizantes voláteis que contribuem para o seu perfil sensorial (SGARBI et al., 2013). *L. rhamnosus*, *L. casei* e *L. plantarum* são consideradas espécies desejadas nos queijos devido a suas características sensoriais e pelo papel probiótico das mesmas (HOLZAPFEL et al., 2001), em especial, a capacidade de antagonizar patógenos de importância à saúde pública (ANDRADE et al., 2014).

O antagonismo de BAL sobre patógenos tem sido amplamente demonstrado em diversos estudos. Na pesquisa de Ferrari et al. (2016) verificou-se que *Lactobacillus brevis* (*L. brevis*) e *Lactobacillus paracasei* (*L. paracasei*)

isolados de leite de cabra foram capazes de antagonizar *L. monocytogenes*, *S. Typhi* e *S. aureus*, formando halos com diâmetro de até 11,40 mm. Caggia et al., (2015) mostraram inibição de *L. paracasei* e *L. rhamnosus* contra *E. coli*, *L. monocytogenes* e *S. aureus*, formando halos com diâmetro superiores a 8 mm. Alegría et al. (2010) estudaram a capacidade antagônica de *L. lactis* contra diversos microrganismos e observaram baixa inibição contra *S. aureus*.

González et al. (2007) estudaram a atividade antimicrobiana de 395 estirpes de bactérias lácticas (137 *Lactobacillus*, 125 *Lactococcus*, 58 *Leuconostoc* e 75 *Enterococcus*) isolados de queijo Genestoso durante o período de maturação contra uma série de microrganismos, incluindo, *L. monocytogenes* e *S. aureus*. Os pesquisadores verificaram que 78% das BAL avaliadas apresentaram atividade antimicrobiana contra algum dos 6 microrganismos indicadores analisados. Os autores verificaram ainda que a inibição observada foi resultante principalmente pela presença de ácidos orgânicos e peróxido de hidrogênio. No presente estudo, os resultados mostram maior atividade antagônica (Figura 3 e 4) por parte dos isolados de M17. Embora a natureza da inibição não tenha sido completamente elucidada, é possível constatar que os ácidos orgânicos têm influência na inibição dos patógenos, mas não são exclusivamente responsáveis por ela.

L. monocytogenes é um patógeno frequentemente encontrado em diversos produtos alimentícios cuja presença já foi relatada em diferentes tipos de queijos, como no queijo Minas frescal (DESTRO et al., 1991; FURLANETTO et al., 1996; BRITO et al., 2008; APOLINÁRIO et al., 2014), queijo coalho (BRANCO et al., 2003; SOUZA et al., 2006), ricota (ESPER, 2006) e queijo muçarela (LIMA et al., 2015). Embora casos de listeriose em humanos sejam raros, esse patógeno é potencialmente perigoso principalmente para neonatos, mulheres grávidas, idosos e indivíduos imunodeprimidos (SWAMINATHAN; GERNER-SMIDT, 2007). Este foi o patógeno que apresentou maior resistência aos metabólitos antagonistas produzidos pelos isolados em MRS e M17, uma vez que nenhuma inibição foi observada em 20% desses isolados (Figura 2D e 3D). Essa resistência pode estar relacionada à sua variada composição de ácidos graxos da membrana externa com reduzida concentração de fosfolipídios (ABEE et al., 1995), que possivelmente protegem esse microrganismo do meio em que o cerca, pois, essas características de membrana dificultam a formação

de poros na parede celular, impedindo a ação de bacteriocinas (ABEE et al., 1995).

O papel do fermento endógeno de garantir uma rápida produção de ácido é, provavelmente, o fenômeno mais importante responsável para segurança do queijo Minas feito com leite cru. No presente estudo, a neutralização do meio promoveu redução do tamanho dos halos de inibição de diversos isolados (Figura 2 e 4), indicando que os ácidos orgânicos produzidos pelos isolados de MRS e M17 influenciam no antagonismo de microrganismos indesejáveis. *L. monocytogenes* apresentou maior sensibilidade no meio tamponado (Tabela 1). O decréscimo do efeito inibitório após a neutralização do meio de crescimento indica redução do antagonismo exercido pelos ácidos orgânicos ali presentes, além de elucidar a presença de outras substâncias antagonistas de natureza não ácida, como diacetil, acetaldeído e de natureza proteica como bacteriocinas (não avaliadas neste estudo).

Tabela 1 – Percentual de redução, aumento ou manutenção do antagonismo (diâmetro dos halos em mm) após o tamponamento do meio MRS no teste de antagonismo dos 49 isolados de bactérias em meios MRS e M17.

	<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>	<i>S. Enteritidis</i>	<i>L. monocytogenes</i>
Redução (%)	55,1	59,2	63,3	87,8
Aumento (%)	28,6	20,4	28,6	2,0
Manutenção (%)	16,3	20,4	8,2	10,2
Total (%)	100	100	100	100

A queda no pH resultante da produção de ácido lático e outros ácidos orgânicos pode ser suficiente para inibir o crescimento bacteriano. A inibição ocorre pelo efeito que a forma não dissociada dos ácidos desencadeia, diminuindo o pH intracelular e provocando um colapso no gradiente eletroquímico de prótons em bactérias sensíveis (ZAKI et al., 2015). Assim, a acidificação do citoplasma compromete o transporte de nutrientes, o metabolismo de aminoácidos e energia, a síntese do material genético, gerando um efeito bacteriostático ou bactericida (ZAKI et al., 2015). As concentrações e os tipos de ácidos orgânicos produzidos durante o processo de fermentação irão depender da espécie microbiana, da presença ou ausência de outros

microrganismos e das condições de crescimento (LINDGREN, DOBROGOSZ, 1990; YANG, 2000).

Além dos ácidos orgânicos, as BAL são capazes de produzir diversas substâncias antimicrobianas como o diacetil, peróxido de hidrogênio e bacteriocinas (LINDGREN, DOBROGOSZ, 1990; STILES, 1996; HOLZAPFEL et al., 2001), ou mesmo vitaminas, antioxidantes e peptídeos bioativos (FAVARO et al., 2015).

Dentre os 49 isolados avaliados nesse estudo, 44 (89,9%) apresentaram atividade proteolítica. A proteólise é o processo de degradação das proteínas do leite por ação de enzimas que resulta em peptídeos e aminoácidos de cadeia média ou curta. Essas enzimas podem ser de origem natural no leite e/ou produzidas por BAL, que são as principais responsáveis pela geração de peptídeos bioativos em produtos lácteos fermentados (SMACCHI, GOBBETTI, 2000). Esses resultados indicam que o antagonismo observado para os 44 isolados proteolíticos, pode ser, em parte, devido ao acúmulo de peptídeos bioativos resultantes da proteólise.

As bactérias lácticas carregam um complexo sistema proteolítico e são tidas como potenciais ativadoras de peptídeos devido à capacidade de hidrolisar mais de 40% das ligações peptídicas da caseína. Os peptídeos fazem parte da estrutura primária das proteínas do leite e são liberados durante proteólise na fase de maturação do queijo (KORHONEN; PIHLANTO, 2006). Os peptídeos resultantes apresentam de 4 a 40 resíduos de aminoácidos (MINERVINI et al., 2003). Essa proteólise é também responsável pela geração de compostos que influenciam no sabor, aroma e textura dos queijos (PANESAR et al., 2013).

De maneira geral, peptídeos antimicrobianos atuam na membrana plasmática das bactérias por meio de uma ligação eletrostática dos grupamentos catiônicos dos peptídeos com os grupamentos fosfatos da membrana, enquanto a parte hidrofóbica dos peptídeos interage com os lipídeos da membrana. Essa interação promove a formação de um canal transmembrana que altera a permeabilidade ou causa a ruptura da membrana plasmática e, como consequência, a desintegração da célula (GOBBETTI et al. 2004; BENKERROUM, 2010). Alguns exemplos de peptídeos com atividade antimicrobiana são: casecidinas (ZUCHT et al., 1995), Lactoferrampina (VAN DER KRAAN et al., 2004), Isracidina (LAHOV, REGELSON, 1996). Esses compostos apresentam atividade antimicrobiana contra bactérias gram-positivas

e gram-negativas, incluindo *E. coli*, *Salmonella* Typhi, *S. Enteritidis*, *S. Typhimurium*, *Bacillus cereus* e *S. aureus* (MOHANTY et al., 2014).

Peptídeos com atividade antimicrobiana podem ser gerados a partir de diferentes variedades de queijo. Rizzello et al. (2005) observaram atividade antimicrobiana de peptídeos solúveis em água extraídos de 9 variedades de queijos italianos feitos com leite de vaca, cabra e ovelha contra diversas bactérias, incluindo *E. coli*, *L. innocua*, *B. megaterium* e *S. aureus*. Pritchard et al. (2010) observaram inibição por extratos peptídicos de queijo cheddar da Austrália contra *E. coli* e *B. cereus*. Peptídeos solúveis em água extraídos de queijo coalho do nordeste do Brasil apresentaram a capacidade antagonista na concentração de 50 mg.mL⁻¹ contra *E. faecalis*, *E. coli*, *B. subtilis* e *Pseudomonas aeruginosa* (SILVA et al., 2012). Esses estudos comprovam a atividade antimicrobiana exercida pelos peptídeos bioativos encontrados em diversas variedades de queijos, incluindo queijos feitos com leite cru, em que a microbiota endógena atua na proteólise e maturação, como acontece nos QMA.

Outro composto com características antimicrobianas e que pode ter contribuído para o antagonismo apresentado no presente estudo é o diacetil. O diacetil ou butanodiona (C₄H₆O₂) é produzido por microrganismos incluindo espécies de gêneros pertencentes ao grupo de BAL, sendo obtido a partir do citrato que acumula no meio durante o metabolismo intermediário de espécies de alguns gêneros como *Streptococcus*, *Leuconostoc*, *Lactobacillus*, *Pediococcus* e *Oenococcus* (BARTOWSKY; HENSCHKE, 2004). Dentre os 49 isolados estudados, 45 (91,8%) foram caracterizados como capazes de produzir diacetil. O diacetil age sobre as bactérias por meio do bloqueio do sítio catalítico da enzima responsável pela utilização de arginina, tornando as células microbianas incapazes de sintetizar proteínas essenciais (HOLZAPFEL et al., 2003; LANCIOTTI et al., 2003; OUWEHAND; VESTERLUND, 2004). É caracterizado como um composto antimicrobiano de amplo espectro, sendo mais efetivo contra bactérias gram-negativas, como *E. coli* e *Salmonella* spp. (LANCIOTTI et al., 2003). Segundo Jay (1982), o efeito do diacetil sobre bactérias gram-positivas é bacteriostático, enquanto contra bactérias gram-negativas, é bactericida. No presente estudo, considera-se a possibilidade desse composto contribuir para a atividade antimicrobiana exercida sobre os patógenos indicadores pelos isolados do pingaço do queijo Canastra, visto que os isolados

que se mostraram capazes de produzir diacetil geraram diâmetros de halos de inibição maiores em relação àqueles incapazes de produzir este metabólito.

Estudos demonstraram a eficácia do diacetil na inibição ou na eliminação de vários microrganismos, incluindo *Salmonella* sp. (KANG, FUNG, 1999; ARCHER et al., 1996), *E. coli* (KANG, FUNG, 1999; LANCIOTTI et al., 2003), *L. monocytogenes* (LANCIOTTI et al., 2003) e *S. aureus* (LANCIOTTI et al., 2003). Apesar desses estudos indicarem a eficácia do diacetil como antimicrobiano, para Piard e Desmazeaud (1991) este composto raramente é encontrado em produtos alimentícios em concentrações suficientes (aproximadamente 200 mM) para exercer a inibição, pois causaria alteração no aroma e sabor do produto final. No presente estudo, os protocolos utilizados não permitiram a quantificação das concentrações do diacetil produzido pelos isolados, no entanto, nos isolados em que a capacidade de produzir esse composto foi demonstrada, o antagonismo observado pode ter tido sua contribuição.

Outros compostos não contemplados neste estudo também poderiam ser responsáveis pela atividade antagonista apresentada pelos isolados, como as bacteriocinas e o peróxido de hidrogênio.

Bacteriocinas são peptídeos antimicrobianos ribossomicamente sintetizados capazes de produzir um efeito bactericida ou bacteriostático em estirpes relacionadas com as bactérias produtoras (GILLOR et al., 2005). As bacteriocinas produzidas por BAL constituem um grupo heterogêneo de peptídeos que apresentam diferentes espectros de atividade antimicrobiana, determinantes genéticos e características bioquímicas (NETTLES, BAREFOOT, 1993; KLAENHAMMER, 1993). Entretanto, sua atividade antimicrobiana parece estar relacionada ao caráter anfifílico e catiônico da maioria dessas moléculas (OJCIUS, YOUNG, 1991). Bacteriocinas produzidas por BAL isoladas do leite e de produtos lácteos foram capazes de inibir diversos patógenos, como: *B. cereus* (KABUKI et al., 2007), *E. coli*, *S. Typhimurium* (IVANOVA et al., 1998), *L. monocytogenes* (RIBEIRO et al., 2014) e *S. aureus* (RILLA et al., 2004; ALEGRÍA et al., 2010; PINTO et al., 2011).

O peróxido de hidrogênio (H₂O₂) é produzido por bactérias lácticas na presença de oxigênio por meio da ação das enzimas oxidases ou NADH peroxidases e como um mecanismo de proteção contra os radicais de oxigênio (VAN DE GUCHTE et al., 2002). Como as BAL não possuem a enzima catalase, capaz de degradar o peróxido de hidrogênio, esse metabólito se acumula no

meio e exerce efeito inibitório sobre os microrganismos presentes (KONG, DAVISON, 1980). A ação desse composto se dá por meio do seu efeito oxidante, causando a desnaturação de enzimas e a peroxidação de lipídeos de membrana, aumentando assim a permeabilidade da mesma (KONG, DAVISON, 1980). Além disso, o peróxido de hidrogênio pode ser um precursor de radicais livres que podem danificar o DNA (BYCZKOWSKI, GESSNER, 1988).

Dentre os patógenos mais comumente encontrados em QMA, *S. aureus* é o que permanece por mais tempo em concentrações acima do permitido por lei (2 Log UFC.g⁻¹), tendo sido demonstrado níveis de segurança atingidos durante a maturação de 17 dias para os queijos fabricados no Serro e 22 dias para os queijos da Serra da Canastra (MINAS GERAIS, 2008). Dos 49 isolados de BAL do pingo estudados, 47 foram capazes de antagonizar *S. aureus*, porém, houve redução no tamanho dos halos em mais de 59% dos isolados em meio tamponado. Esses resultados demonstram a importância dos ácidos orgânicos, isoladamente ou em conjunto com outros metabólitos produzidos por microrganismos predominantes no fermento endógeno no antagonismo de *S. aureus* durante a maturação do QMA.

4. CONCLUSÃO

A microbiota endógena carregada pelo pingo, é de extrema importância para a segurança microbiológica dos QMA devido à sua atividade antagonista contra diversos patógenos, incluindo, *E. coli*, *L. monocytogenes*, *S. Enteritidis* e *S. aureus*. Embora a natureza da inibição não tenha sido completamente elucidada, foi possível observar que os ácidos orgânicos, diacetil e possíveis peptídeos bioativos influenciam na inibição de patógenos indicadores, embora não sejam os únicos responsáveis pela capacidade antimicrobiana observada.

Fazendo-se uma analogia na metabiose observada na produção de queijos, muitos dos gêneros componentes do grupo de BAL acidificam rapidamente o ambiente antagonizando patógenos. Especificamente, em se tratando de *S. aureus*, sugere-se que a inibição ocorre não só pelo acúmulo de ácido, mas também pela depleção de vitaminas e outros nutrientes específicos essenciais para o crescimento de *Staphylococcus*. A capacidade da espécie de contornar o estresse ácido com a produção de proteínas de superfície e da provável localização dessas proteínas de proteção no mesmo locus da produção da toxina, sugere ser uma das razões do elevado consumo de QMA fresco, as

vezes com concentrações estafilocócicas acima das exigidas na legislação e ainda assim não ser detectada a atividade da enterotoxina.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABEE, T.; KROCKEL, L.; HILL, C. Bacteriocins: mode of action and potentials in food preservation and control of food poisoning. **Journal of Food Microbiology**, v. 28, p. 169–185, 1995.
- ALEGRÍA, A.; DELGADO, S.; ROCES, C.; LÓPEZ, B.; MAYO, B. Bacteriocins produced by wild *Lactococcus lactis* strains isolated from traditional, starter-free cheeses made of raw milk. **International Journal of Food Microbiology**, v. 143, n. 1–2, p. 61–66, 2010.
- ANDRADE, C.R.G.; SOUZA, M.R.; PENNA, C.F.A.M.; ACURCIO, L.B.; SANT'ANNA, F.M.; CASTRO, R.D.; OLIVEIRA, D.L.S. Propriedades probióticas in vitro de *Lactobacillus* spp. isolados de queijos minas artesanais da Serra da Canastra – MG. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.66, n.5, p.1592-1600, 2014
- APOLINÁRIO, T.C.C.; SANTOS, G.S.; LAVORATO, J.A.A. Avaliação da qualidade microbiológica do queijo Minas frescal produzido por laticínios do estado de Minas Gerais. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, v. 69, n. 6, p. 433-442, 2014.
- ARAÚJO, R. A. B. et al. Avaliação de *Staphylococcus aureus* em queijo Minas artesanal produzido na região de Araxá. In: ENCONTRO NACIONAL DE ANALISTAS DE ALIMENTOS, 14, Goiânia – GO, 2005. **Anais**. Goiânia, 2005.
- ARCHER, M.H.; DILLON, V.M.; CAMPBELL-PLATT, G.; OWENS, J.D. Effect of diacetyl on growth rate of *Salmonella typhimurium* determined from detection times measured in a microwell plate photometer. **Food Control**, v. 7, n. 2, p. 63–67, 1996.
- BARTOWSKY, E.J.; HENSCHKE, P.A. The 'buttery' attribute of wine—diacetyl—desirability, spoilage and beyond. **International Journal of Food Microbiology**, v.96, nº 3, p. 235-252, 2004.
- BENKERROUM, N. Antimicrobial peptides generated from milk proteins: a survey and prospects for application in the food industry. A review. **International Journal of Dairy Technology**, v. 63, 320-338, 2010.
- BERGONIER, D.; SOBRAL, D.; FEßLER, A.T.; JACQUET, E.; GILBERT, F.B.; SCHWARZ, S.; TREILLES, M.; BOULOC, P.; POURCEL, C.; VERGNAUD, G. *Staphylococcus aureus* from 152 cases of bovine, ovine and caprine mastitis investigated by Multiple-locus variable number of tandem repeat analysis (MLVA). **Veterinary Research**, 45(1): 97, 2014.
- BORELLI, B. M. Enterotoxigenic *Staphylococcus* spp. and other microbial contaminants during production of Canastra cheese, Brazil. **Brazilian journal of Microbiology**, v. 37, 545-550, 2006.
- BRANCO, M.A.A.C.; FIGUEIREDO, A.T.; BORGES, M.F.; SILVA, M.D.D.; DESTRO, M.T. Incidência de *Listeria monocytogenes* em queijo de coalho refrigerado produzido artificialmente. **Boletim CEPPA**, v.21, n.2, p.393-408, 2003.
- BRANT, L. M. F.; FONSECA, L. M.; SILVA, M. C. C. Avaliação da qualidade microbiológica do queijo-de-minas artesanal do Serro-MG. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 59, n. 6, p. 1570-1574, 2007.

- BRITO, J.R.; SANTOS, E.M.P.; ARCURI, E.F.; LANGE, C.C.; BRITO, M.A.V.P.; SOUZA, G.N. et al. Retail survey of brazilian milk and Minas frescal cheese and a contaminated dairy plant to establish prevalence, relatedness, and sources of *Listeria monocytogenes* isolates. **Applied and Environmental Microbiology**, 74:4954-61, 2008.
- BYCZKOWSKI, J.Z.; GESSNER, T. Biological role of superoxide ion-radical. **International Journal of Biochemical**, v. 20, n. 6, p. 569-580, 1988
- CAGGIA, C.; DE ANGELIS, M.; PINO, A.; RANDAZZO, C.L. Probiotic features of *Lactobacillus* strains isolated from Ragusano and Pecorino Siciliano cheeses. **Food Microbiology**, v. 50, p.109-117, 2015.
- COLLINS, C. H.; LYNE, P. M. **Microbiological methods**. London: Butterworths, 1976.
- COTTER, P.D.; HILL, C.; ROSS, R. P. Bacteriocins: Developing innate immunity for food. **Nature Reviews Microbiology**, v. 3, p. 777-788, 2005.
- DAECHEL, M.A. Antimicrobial substances from lactic acid bacteria for use as food preservatives. **Food Technology**, v. 43, p. 164-167, 1989.
- DE MAN, J.C.; ROGOSA, M.; SHARPE, E.M. A medium for the cultivation of Lactobacilli. **Journal Applied Microbiology**, v. 23, p. 130-135, 1960.
- DE VUYST, L.; LEROY, F. Bacteriocins from lactic acid bacteria: Production, purification and food applications. **Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology**. 13: 194-199, 2007.
- DESTRO, M.T.; MELO SERRANO, A. de; KABUKI, D.Y. Isolation of *Listeria* species from some Brazilian meat and dairy products. **Food Control**, v.2, n.2, p.110-112, 1991.
- DORES, M.T.; DIAS, R.S.; ARCURI, E.F.; NOBREGA, J.E.; FERREIRA, C.L.L.F. Enterotoxigenic potential of *Staphylococcus aureus* isolated from Artisan Minas cheese from the Serra da Canastra - MG, Brazil. **Food Science and Technology**, v. 33, n. 2, p. 271-275, 2013a.
- DORES, M.T.; NOBREGA, J.E.; FERREIRA, C.L.L.F. Room temperature aging to guarantee microbiological safety of brasilian artisan canastra cheese. **Revista Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 33, n.1, 2013b.
- Empresa de Assistência Técnica e Extensão Rural do Estado de Minas Gerais / EMATER-MG. **Mapa do Queijo Minas Artesanal**. 2015. Disponível em: http://www.emater.mg.gov.br/portal.cgi?flagweb=site_pgn_downloads_vert&gru po=135&menu=59. Acesso em 15 janeiro de 2017.
- ESPER, L.M.R. **Diagnóstico da qualidade de ricotas comercializadas no município de Campinas – SP**. 2006. 97f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos) – Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2006.
- FAVARO, L.; PENNA, A.L.B.; TODOROV, S.D. Bacteriocinogenic LAB from cheeses – Application in biopreservation? **Trends in Food Science & Technology**, v.41, n. 1, p. 37–48, 2015.
- FERRARI, I.S.; SOUZA, J.V.; RAMOS, C.L.; COSTA, M.M.; SCHWAN, R.F.; DIAS, F.D. Selection of autochthonous lactic acid bacteria from goat dairies and their addition to evaluate the inhibition of *Salmonella typhi* in artisanal cheese. **Food Microbiology**, v. 60, p. 29–38, 2016.

FLEMING, H.P.; ETCHELLS, J.L.; COSTILOW, R.N. Microbial inhibition by isolate of *Pediococcus* from cucumber briner. **Applied Microbiology**, v. 30, n. 6, p. 1040-1042, 1975.

FRANCIOSI, E; SETTENNI, L.; CAVAZZA, A.; POZNASKI, E. Biodiversity and technological potencial of wild lactic acid bacteria from raw cows' milk. **International dairy Journal**. 19: 3-11, 2009Nacional, 2 p., 2009.

FURLANETTO, S.M.P.; SANTOS, M.A.A.; HARA, C. *Listeria* spp: Avaliação da eficiência de quatro meios de plaqueamento no seu isolamento. **Higiene Alimentar**, v.10, n.46, p.30-34, 1996.

GILLOR, O.; NIGRO, L.M.; RILEY, M.A. Genetically engineered bacteriocins and their potential as the next generation of antimicrobials. **Current Pharmaceutical Biotechnology**, v. 11, n. 8, p. 1067-75, 2005.

GOBBETTI, M.; MINERVINI, F.; RIZZELLO, C.G. Angiotensin I-converting-enzyme-inhibitory and antimicrobial bioactive peptides. **International Journal of Dairy Technology**, v.57, n. 2/3, 2004.

GONZÁLEZ, L.; SANDOVAL, H.; SACRISTÁN, N.; CASTRO, J.M.; FRESNO, J.M.; TORNADIJO, M.E. Identification of lactic acid bacteria isolated from Genestoso cheese throughout ripening and study of their antimicrobial activity. **Food Control**, v. 18, n. 6, p. 716–722, 2007.

HAINES, W.C.; HARMON, L.G. Effect of selected lactic acid bacteria on growth of *Staphylococcus aureus* and production of enterotoxin. **Applied Microbiology**., v, 25, p. 436–441, 1973.

HAMMER, B.W.; BABEL F.J. **Dairy bacteriology**.4th ed. John Wiley & Sons Inc., New York, 1957.

HARRIS, L.J.; DAESCHEL, M.A.; STILES, M.E.; KLAENHAMMER, T.R. Antimicrobial activity of lactic acid bacteria against *Listeria monocytogenes*. **Journal of Food Protection**, 52(9):384-387, 1989.

HOLZAPFEL, W.H.; HABERER, P.; GEISEN, R.; BJÖRKROTH, J.; SCHILLINGER, U. Taxonomy and important features of probiotic microorganisms in food nutrition. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 73, p. 365S–373S, 2001.

HOLZAPFEL, W.H.; SCHILLINGER, U.; GEISEN, R.; LUCKE, F.K. Starter and protective cultures. In: RUSSELL, N.J.; GOULD, G.W. (Eds.), **Food Preservatives**, Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York, p. 291–320, 2003.

INSTITUTO DO PATRIMÔNIO HISTÓRICO E ARTÍSTICO NACIONAL – IPHAN. Ministério da Cultura. Serviço Público Federal. **Certidão do Registro do modo artesanal de fazer queijo de Minas, nas Regiões do Serro e nas Serras da Canastra e do Salitre**. Data do Registro: 13 jun. 2008. Brasília: Departamento do Patrimônio Imaterial do Instituto do Patrimônio Histórico e Artístico Nacional, 2 p., 2008.

INSTITUTO MINEIRO DE AGROPECUÁRIA - IMA. Portaria nº 1305, de 30 de abril de 2013. **Estabelece diretrizes para a produção do queijo Minas artesanal**. 2013.

IVANOVA, I.; MITEVA, V.; STEFANOVA, T.S.; PANTEV, A.; BUDAKOV, I.; DANOVA, S.; MONCHEVA, P.; NIKOLOVA, I.; DOUSSET, X.; BOYAVAL, P.

- Characterization of a bacteriocin produced by *Streptococcus thermophilus* 81. **International Journal of Food Microbiology**, v. 42, n. 3, p. 147–158, 1998.
- JAY, J.M. Antimicrobial properties of diacetyl. **Applied and Environmental Microbiology**, p. 525-532, 1982.
- KABUKI, T.; UENISHI, H.; WATANABE, M.; SETO, Y.; NAKAJIMA, H. Characterization of a bacteriocin, Thermophilin 1277, produced by *Streptococcus thermophilus* SBT1277. **Journal of Applied Microbiology**, v, 102, n. 4, p.971-80, 2007.
- KANG, D.H. FUNG, D.Y. Effects of diacetyl on controlling *E. coli* O157:H7 and *Salmonella Typhimurium* in the presence of starter culture in a laboratory medium and during meat fermentation. **Journal of Food Protection**, v. 62, p. 975–979, 1999.
- KASHKET, E.R. Bioenergetics of lactic acid bacteria: Cytoplasmic pH and osmotolerance, **FEMS Microbiology Reviews**, v. 46, p. 233–244, 1987.
- KLAENHAMMER, T.R. Genetics of bacteriocins produced by lactic acid bacteria. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 12, p. 39-86, 1993.
- KONG, S.; ALLAN J. DAVISON, A.J. The Role of Interactions between O_2 , H_2O_2 , $\cdot OH$, e^- and O_2^- ; in free radical damage to biological systems. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 204, n. 1, p. 18-29, 1980.
- KORHONEN, H, PIHLANTO, A. Bioactive peptides: production and functionality. **International Dairy Journal**, v. 16, p. 945-960, 2006.
- LAHOV, E.; REGELSON, W. Antibacterial and immunostimulating casein-derived substances from milk: caseicidin, isracidin peptides. **Food and Chemical Toxicology**, v. 34, p. 131–145, 1996.
- LANCIOTTI, R.; PATRIGNANI, F.; BAGNOLINI, F.; GUERZONI, M.E.; GARDINI, F. Evaluation of diacetyl antimicrobial activity against *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes* and *Staphylococcus aureus*. **Food Microbiology**, v. 20, n. 5, p. 537–543, 2003.
- LIMA, A.C.M.; TOUBAS, L.C.; PEREIRA, A.N.; SILVA, G.B.H.C.; TORRES, I.M.S.; ALVES, V.F. Pesquisa de *Listeria monocytogenes* em queijo muçarela fatiado comercializado em estabelecimentos varejistas na cidade de Goiânia, GO. **Eletronic Journal of Pharmacy**, vol. XII, n. 4, p. 87-92, 2015.
- LIMA, C.; LIMA, L., CERQUEIRA, M.; FERREIRA, E.; ROSA, C. Bactérias do ácido láctico e leveduras associadas com o queijo-de-minas artesanal produzido na região da Serra do Salitre, Minas Gerais. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**. 61(1): 266-272, 2009.
- LINDGREN, S.E.; DOBROGOSZ, W.J. Antagonistic activities of lactic acid bacteria in food and feed fermentations. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 87, p. 149–164, 1990.
- LORCA, G. L.; DE VALDEZ, G. F. *Lactobacillus* Stress Responses. In: *Lactobacillus* Molecular Biology: From Genomics to Probiotics, LJUNGH, Å.; WADSTRÖM, T. (Eds.), **Caister Academic Press**, Norfolk, UK, p. 115–138, 2009.
- MARTINS, J. M.; GALINARI, E.; PIMENTEL-FILHO, N. J.; RIBEIRO JR, J. I.; FURTADO, M. M.; FERREIRA, C.L.L.F. Determining the minimum ripening time

of artisanal Minas cheese, a traditional Brazilian cheese. **Brazilian Journal of Microbiology** (Online). 46: 219-230, 2015.

MINAS GERAIS. Assembleia Legislativa do Estado de Minas Gerais. Decreto nº 44.864 de 01 de agosto de 2008. **Altera o regulamento da lei nº14.185 de 31 de janeiro de 2002, que dispõe sobre o processo de produção do queijo Minas artesanal**. Belo Horizonte: Assembléia Legislativa do Estado de Minas Gerais, 2008.

MINERVINI, F.; ALGARON, F.; RIZZELLO, C.G.; FOX, P.F.; MONNET, V.; GOBBETTI, M. Angiotensin I-converting-enzyme-inhibitory and antibacterial peptides from *Lactobacillus helveticus* PR4 proteinase-hydrolyzed caseins of milk from six species. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 69, p. 5297–5305, 2003.

MOHANTY, D.P.; TRIPATHY, P.; MOHAPATRA, S.; SAMANTARAY, D.P. Bioactive potential assessment of antibacterial peptide produced by *Lactobacillus* isolated from milk and milk products. **International Journal of Current Microbiology and Applied**, v. 3, p. 72–80, 2014.

NETTLES, C.G., BAREFOOT, S.F. Biochemical and genetic characteristics of bacteriocins of food-associated lactic acid bacteria. **Journal of Food Protection**, v. 56, n. 4, p. 338-356, 1993.

OJCIUS D.M.; YOUNG, J.D.E. Cytolytic pore-forming proteins and peptides - is there a common structural motif. **Trends in Biochemical Sciences**, Oxford, v. 16, n. 6, p. 225-229, 1991.

OUWEHAND, A.C.; VESTERLUND, S. Antimicrobial componentes from lactic bactéria. In: SALMINEN, S.; VON WRIGHT, A.; OUWEHAND, A. **Lactic Acid Bacteria: Microbiological and Functional Aspects**. 3.ed. Nova Iorque: Marcel Dekker, 2004.

PANESAR, P.S.; KUMARI, S.; PANESAR, R. Biotechnological approaches for the production of prebiotics and their potential applications. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 33, p. 345–364, 2013.

PIARD, J.C.; DESMAZEAUD, M. Inhibition factors produced by lactic bacteria. Oxygen metabolites and catabolism end-products. **Lait**, v.71, p. 525-541, 1991.

PINTO, M.S.; CARVALHO, A.F.; PIRES, A.C.S.; SOUZA, A.A.C.; SILVA, P.H.F.; SOBRAL, D.; PAULA, J.C.J.; SANTOS, A.L. The effects of nisin on *Staphylococcus aureus* count and the physicochemical properties of Traditional Minas Serro cheese, **International Dairy Journal**, v. 21, n. 2, p. 90–96, 2011

PRITCHARD, S. R.; PHILLIPS, M.; KAILASAPATHY, K. Indentification of bioactive peptides in commercial cheddar cheese. **Food Research International**, v. 43, 1545 – 1548, 2010.

REID, G. Probiotic lactobacilli for urogenital health in women. **Journal of Clinical Gastroenterology**. (Suppl. 3), v. 42, 234–236, 2008.

RIBEIRO, S.C.; COELHO, M.C.; TODOROV, S.D.; FRANCO, B.; DAPKEVICIUS, M.L.E.; SILVA, C.C.G. Technological properties of bacteriocin-producing lactic acid bacteria isolated from Pico cheese an artisanal cow's milk cheese. **Journal of Applied Microbiology**, v. 116, p. 573–585, 2014.

RILLA, N.; MARTINEZ, B.; RODRIGUEZ, A. Inhibition of a methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strain in Afuega' LPitu cheese by the nisin Z producing

- strain *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* IPLA 729. **Journal of Food Protection**, v. 67, p. 928–933, 2004.
- RIZZELO, C.G.; LOSITO, I.; GOBBETTI, M.; CARBONARA, T.; DEBARL, M.D.; ZIMBONIN, P.C. Antibacterial activities of peptides from the water-soluble extracts of Italian cheese varieties. **Journal of Dairy Science**, v.88, 2348-2360, 2005.
- ROGELJ, I.; BOGOVIČ-MATIJAŠIČ, B. Bacteriocins of lactic acid Bacteria – Properties, range of inhibitory activity and methods of detection. **Food Technology and Biotechnology**, v. 32, p. 171–174, 1994.
- SGARBI, E.; LAZZI, C.; TABANELLI, G.; GATTI, M.; NEVIANI, E.; GARINI, F. Nonstarter lactic acid bacteria volatiles produced using cheese components. **Journal of Dairy Science**, 7, 4223–4234, 2013.
- SILVA, R.A.; LIMA, M.S.F.; VIANA, J.B.M.; BEZERRA, V.S.; PIMENTEL, M.C.B.; PORTO, A.L.F.; CAVALCANTI, M.T.H.; LIMA FILHO, J.L. Can artisanal “Coalho” cheese from Northeastern Brazil be used as a functional food? **Food Chemistry**, v. 135, n. 3, p. 1533–1538, 2012.
- SMACCHI, E.; GOBBETTI, M. Bioactive peptides in dairy products: synthesis and interaction with proteolytic enzymes. **Food Microbiology**, v.17, p. 129-141, 2000.
- SOUZA, R.A.; FIGUEIREDO, E.A.T.; MAIA, G.A.; FRIZ-ZO, S.E. Incidência de *Listeria monocytogenes* em queijo de coalho artesanal, comercializado à temperatura ambiente em Fortaleza, CE. **Higiene Alimentar**, v.20, p.66-69, 2006.
- SOUZA, V.; MELO, P.C.; MEDEIROS, M.I.M.; CONDE, S.O.; NADER FILHO, A. Estirpes de *Staphylococcus aureus* isoladas de queijo Minas artesanal de Araxá. **Ars Veterinaria**, Jaboticabal, SP, v.31, n.1, 019-023, 2015.
- STILES, E.M. Biopreservation by lactic acid bacteria. **Antonie Leeuwenhoek**, v.70, p. 331–345, 1996.
- SUSKOVIC, J.; KOD, B.; BEGANOVIC, J.; PAVUNC, A.L.; HABJANIC, K.; MOTOSIC, S. Antimicrobial activity – the most important property of probiotic and starter lactic acid bacteria. **Food Technol Biotechnol** 48(3):296-307, 2010.
- SWAMINATHAN, B.; GERNER-SMIDT, P. The epidemiology of human listeriosis. **Microbes and Infection**, v. 9, n.10, p. 1236-1243, 2007.
- TERZAGHI, B.E.; SANDINE, W.E. Improved medium for lactic Streptococci and their bacteriophages. **Journal of Applied Microbiology**, v. 29, n. 6, p.807-813, 1975.
- TOURÉ, R.; KHEADR, E.; LACROIX, C.; MORONI, O.; FLISS, I. Production of antibacterial substances by bifidobacterial isolates from infant stool active against *Listeria monocytogenes*. **Journal of Applied Microbiology**, v. 95, p. 1058-1069, 2003.
- VAN DE GUCHTE, M. SERROR, P.; CHERVAUX, C.; SMOKVINA, T.; EHRlich, S.; MAGUIN, E. Stress responses in lactic acid bacteria. **Antonie Van Leeuwenhoek**, v.82, p.187, 2002.
- VAN DER KRAAN, M.I.; NAZMI, K.; TEEKEN, A.; GROENINK, J.; VANT HOF, W.; VEERMAN, E.C.; BOLSCHER, J.G.; NIEUW AMERONGEN, A.V. Lactoferrampin, an antimicrobial peptide of bovine lactoferrin, exerts its

candidacidal activity by a cluster of positively charged residues at the C-terminus in combination with a helix-facilitating N-terminal part. **Biological Chemistry**, v. 386, p. 137–142, 2004.

YANG, Z. **Antimicrobial compounds and extracellular polysaccharides produced by lactic acid bacteria**: Structures and properties. University of Helsinki, Helsinki, 2000.

ZAKI, H.M.B.A.; MOHAMED, H.M.H.; EL-SHERIF, A.M.A. Improving the antimicrobial efficacy of organic acids against *Salmonella enterica* attached to chicken skin using SDS with acceptable sensory quality. **LWT - Food Science and Technology**, v. 64, n. 2, p. 558–564

ZUCHT, H.D.; RAIDA, M.; ADERMANN, K.; MAGERT, H.J.; FORSSMAN, W.G. Casocidin-I: a casein α s2-derived peptide exhibits antibacterial activity. **FEBS Letters**, v. 372, p. 185–188, 1995.

CONCLUSÕES GERAIS

A produção de queijo Minas artesanal na Serra da Canastra é uma atividade tradicional responsável pelo sustento de diversas famílias mineiras que proporciona satisfação entre os produtores com a atividade, apesar do baixo retorno financeiro por alguns deles. Graças às recomendações de órgãos estaduais como o IMA (Instituto Mineiro de Agropecuária) e EMATER (Empresa de Assistência Técnica e Extensão Rural do Estado de Minas Gerais), as instalações têm se mantido adequadas para a produção, com condições higiênicas satisfatórias.

Todos os produtores entrevistados utilizam o pingo como fermento, que por ser originado de um produto artesanal, apresenta características físico-químicas e microbiológicas variadas entre as diferentes propriedades.

Por ser oriundo de queijo fresco feito com leite cru, o pingo apresenta uma microbiota predominantemente composta por bactérias do ácido láctico, embora estirpes de espécies patogênicas possam estar presentes. A microbiota predominante do fermento endógeno é capaz de inibir microrganismos patogênicos indicadores como *E. coli*, *S. aureus*, *L. monocytogenes* e *S. Enteritidis* graças à produção de metabólitos antimicrobianos como ácidos orgânicos, diacetil e possivelmente de peptídeos antimicrobianos, dentre outros.

Observou-se a importância das espécies *Enterococcus faecalis* e *Lactobacillus plantarum* prevalentes no pingo. Essas são espécies de BAL, por sua tolerância ao sal, exercem um importante papel no antagonismo de estirpes estafilocócicas. Neste estudo, não foram isoladas estirpes de *S. aureus* fazendo com que o pingo, pela prevalência de BAL, exerça um papel protetor no processo de fabricação do QMA carreando uma microbiota com capacidade antagonista a patógenos.

As Boas práticas de fabricação implementadas em um ambiente de fazenda diferem em muito daquelas implementadas nas indústrias e antes que essas implementações sejam exigidas, estudos devem ser feitos para previsão das alterações que as mesmas podem causar no processo produtivo do QMA. Como exemplo, sempre é citada a proibição das bancas de madeira que, fizeram com que o produtor reinventasse a produção do QMA. Essa exigência conduziu à utilização da rala para contrapor ao aumento do tempo coagulação até o corte da massa e a um dessoramento incompleto pela mudança nas superfícies de trabalho. Essa mudança alterou a dinâmica microbiana e a segurança do

processo foi diminuída, resultando num aumento do tempo de maturação nas regiões onde a prática foi estabelecida.

Durante a elaboração desse estudo, constatou a importância de políticas públicas que, se aplicadas poderão contribuir para a produção de um leite melhor qualidade, aumentando assim a segurança do QMA e permitirá o consumo dos mesmos com um tempo menor de fabricação. Essa possibilidade é uma prioridade para os produtores que esperam uma legislação mais justa para que possam consolidar suas expectativas e dessa forma, trabalhar na legalidade e atender a demanda do consumidor.

ANEXOS

ANEXO I - Questionário queijo Minas artesanal: condições de processamento

1 – IDENTIFICAÇÃO

Nome: _____

Idade: _____ Código: _____

Região produtora dos queijos: Serro () Canastra ()

Microrregião: _____

Cidade: _____

2 – INFORMAÇÕES GERAIS

2.1 – DA PRODUÇÃO

- a) Quantos litros de leite produz/dia? _____
- b) Quantos queijos produz/dia? _____
- c) Qual o peso médio do queijo? _____
- d) Quantos litros de leite/Kg de queijos? _____
- e) Com quantos dias os queijos são comercializados ou entregues ao entreposto ou cooperativa? _____
- f) Qual o valor unitário dos queijos? _____

OBS:

2.2 – HÁ QUANTO TEMPO FAZ QUEIJO?

- a) () < 5 anos
- b) () Entre 5 e 10 anos
- c) () Entre 11 e 15 anos
- d) () > 16 anos

OBS:

2.3 - QUEM FAZ OS QUEIJOS (QUEIJEIRO)?

- a) () Empregado
- b) () Dono da propriedade

OBS:

2.4 – NÍVEL DE ESCOLARIDADE DO QUEIJEIRO

- | | |
|---|---|
| a) ☐ Não é alfabetizado | e) ☐ Ensino médio completo |
| b) ☐ Ensino fundamental incompleto | f) ☐ Curso superior |
| c) ☐ Ensino fundamental completo | g) ☐ Pós graduação |
| d) ☐ Ensino médio incompleto | |

OBS:

2.5– DESTINO DOS QUEIJOS (Mais de uma opção pode ser marcada)

- | | | |
|--|---|--|
| a) ☐ Este município | b) ☐ Outros municípios | c) ☐ Outros Estados |
|--|---|--|

OBS:

2.6 – FORMA DE VENDA

- | | | |
|---|---|--|
| d) ☐ Diretamente aos
consumidores | e) ☐ Diretamente aos
comerciantes | f) ☐ A comerciantes e a
consumidores |
|---|---|--|

OBS:

2.7 – A PRODUÇÃO DE QUEIJO É O ÚNICO SUSTENTO DA FAMÍLIA? ☐ Sim ☐ Não

OBS:

2.8 – QUANTAS PESSOAS DEPENDEM DESSA PRODUÇÃO?

- | | |
|--|--|
| a) ☐ ≤ 3 pessoas | c) ☐ De 6 a 7 pessoas |
| b) ☐ De 4 a 5 pessoas | d) ☐ ≥ 8 pessoas |

OBS:

2.9 – LOCAL DE COMERCIALIZAÇÃO

- | | |
|---|---|
| a) ☐ Feira livre | d) ☐ Supermercado |
| b) ☐ Padaria | e) ☐ Desconhece |
| c) ☐ Mercadoria | f) ☐ Outros: _____ |

OBS:

2.10 – PERTENCE A ALGUMA ENTIDADE DE CLASSE? ☐ Sim ☐ Não

OBS: (Identificar)_____

2.11 – VOCÊ PARTICIPA DE REUNIÕES DE ENTIDADE DE CLASSE

- | | |
|--|---|
| a) ☐ Sempre que é convidado | d) ☐ Nunca participou |
| b) ☐ Muitas vezes | e) ☐ Nunca foi convidado |
| c) ☐ Poucas vezes | |

OBS:

2.12 – VOCÊ ACHA IMPORTANTE PARTICIPAR DE UMA ENTIDADE DE CLASSE? () Sim () Não

OBS:

2.13 – VOCÊ PARTICIPA OU JÁ PARTICIPOU DE ALGUM TIPO DE TREINAMENTO PARA PRODUÇÃO DE QUEIJOS? () Sim () Não

2.13.1 – Qual a data do último treinamento? _____

2.13.2 - Qual(ais) foi(ram) a(s) entidade(s) envolvida(s) nesse treinamento? _____

2.13.3 - Por que você não participa de treinamentos?

- | | |
|------------------------------|---------------------------|
| a) () Falta de convite | c) () Acha desnecessário |
| b) () Falta de oportunidade | d) () Outro: _____ |

OBS:

3 –OBTENÇÃO DA MATÉRIA-PRIMA

3.1 – TEMPO DO INÍCIO DA ORDENHA AO INÍCIO DA PRODUÇÃO DO QUEIJO

- | | |
|--------------------------|-----------------------|
| a) () ≤ 50 minutos | b) () > 50 minutos |
|--------------------------|-----------------------|

OBS:

3.2 - MÉTODO DE ORDENHA

- | | |
|---------------|-----------------|
| a) () Manual | b) () Mecânica |
|---------------|-----------------|

Se utilizar ordenhadeira mecânica, responder as questões 3.3 e 3.4. Se a ordenha for manual, passar para questão 3.5.

3.3 - POR QUE VOCÊ UTILIZA ORDENHADEIRA MECÂNICA? (Pode marcar mais de uma opção)

- | | |
|---|--------------------------------|
| a) () Praticidade na ordenha | d) () Exigência da legislação |
| b) () Rapidez da ordenha | e) () Outro: _____ |
| c) () Influencia na qualidade do leite | |

OBS:

3.4 COMO É FEITA A HIGIENIZAÇÃO DA ORDENHADEIRA MECÂNICA? FAVOR DESCREVER

3.5 – PRINCIPAL RAÇA DO REBANHO _____

3.6 – TAMANHO ATUAL DO REBANHO _____

3.7 - EM RELAÇÃO AOS ÚLTIMOS ANOS, SEU REBANHO TEM:

- a) ☐ Aumentado b) ☐ Diminuído c) ☐ Se manteve inalterado

OBS:

3.8 – ALIMENTAÇÃO PRINCIPAL DO REBANHO

- a) ☐ Braquiária c) ☐ Silagem
b) ☐ Capim meloso d) ☐ Outro: _____

OBS:

3.9 – VOCÊ SEMPRE FORNECEU ESSE ALIMENTO AO SEU REBANHO? ☐ Sim ☐ Não

3.10 – SE MUDOU, QUAL FOI A RAZÃO?

3.11 – VOCÊ CONSIDERA QUE A ALIMENTAÇÃO DO ANIMAL INTERFERE NA QUALIDADE DO QUEIJO? ☐ Sim ☐ Não

Por quê?

4 – QUEIJARIA

4.1 – CONSTRUÇÃO

- a) FOCOS DE INSALUBRIDADE NA QUEIJARIA ☐ Sim ☐ Não
b) FOCO DE INSALUBRIDADE NAS ADJACÊNCIAS ☐ Sim ☐ Não

OBS:

4.2 – ANIMAIS DOMÉSTICOS, MOSCAS E ROEDORES (Pode marcar mais de uma)

- a) ☐ Presença de animais domésticos b) ☐ Presença de moscas

c) () Presença de roedores

d) () Outros

OBS:

4.3 – PISO: () Cimento () Cerâmica () Outro: _____

OBS:

4.4 – PAREDES: () Alvenaria () Madeira () Outro: _____

OBS:

4.5 – REVESTIMENTO DAS PAREDES: () Tinta lavável () Azulejo () Outro: _____

OBS:

4.5 – TETO

a) () Forro de lage

d) () Telha de amianto

b) () Forro de madeira

e) () Outro: _____

c) () Telha de cerâmica

OBS:

4.6 – PORTAS E JANELAS

a) Manutenção em dia () Sim () Não

b) Proteção contra insetos () Sim () Não

OBS:

4.7 – ILUMINAÇÃO

a) Natural: () Sim () Não

b) Artificial: () Sim () Não

OBS:

4.8 – VENTILAÇÃO: () Adequada () Inadequada

OBS:

4.9 – HOUVE INDICAÇÃO DE ALGUM ÓRGÃO OU INSTITUIÇÃO SOBRE A LOCALIZAÇÃO DA QUEIJARIA E SUAS INSTALAÇÕES? () Sim () Não

Qual (ais)?

4.10 – HIGIENIZAÇÃO GERAL DO LOCAL DE FABRICAÇÃO

a) () Excelente

b) () Boa

c) () Ruim

OBS:

4.11 – QUE SANITIZANTE É UTILIZADO NA HIGIENIZAÇÃO DAS INSTALAÇÕES DA QUEIJARIA?

4.11.1 - Você sempre utilizou esse sanitizante? () Sim () Não

4.11.2 - Se NÃO, por que mudou de sanitizante?

- | | |
|------------------------------|--------------------------------|
| a) () Pela maior eficiência | c) () Exigência da legislação |
| b) () Pelo custo | d) () Outro |

OBS:

4.11.3 - Quanto às características desejáveis dos queijos, esse sanitizante:

- a) () Melhorou b) () Piorou c) () Não alterou d) () Outro

OBS:

4.11.4 – Houve indicação de algum órgão ou instituição sobre a higiene da queijaria e suas instalações? () Sim () Não

Qual (ais)?

5 – ÁGUA DE CONSUMO

5.1 – PROCEDÊNCIA

- | | |
|------------------------------|---------------------|
| a) () Rede de abastecimento | c) () Mina |
| b) () Poço artesiano | d) () Outra: _____ |

OBS:

7 – CRIAÇÃO DE ANIMAIS

7.1 – PROXIMIDADE DO LOCAL DE PROCESSAMENTO

- a) () Até 50 metros b) () De 51 a 100 metros c) () > 100 metros

OBS:

7.2 - OUTROS TIPOS DE CRIAÇÃO

- a) () Aves b) () Suínos c) () Caprinos d) () Outros: _____

OBS:

8 – MANIPULADORES

8.1 – CONTROLE DE SAÚDE (CARTEIRA DE SAÚDE, EXAMES PERIÓDICOS) () Sim () Não

OBS:

8.2 – VESTUÁRIO

- a) ROUPA LIMPA () Sim () Não
- b) COM PROTEÇÃO () Sim () Não
- c) USO DE BOTAS () Sim () Não
- d) PROTEÇÃO DE CABELO () Sim () Não

OBS:

8.3 – VOCÊ ACHA IMPORTANTE O USO DOS EPI'S (Bota, touca, máscara, etc) () Sim () Não

Por quê? _____

8.4 – HÁBITOS HIGIÊNICOS (ASSEPSIA DAS MÃOS/FUMAR/TOSSIR/ETC)

- a) () Adequados
- b) () Inadequados

OBS:

8.5 – ESTADO DE SAÚDE (Pode marcar mais de uma)

- a) () Afecções cutâneas (feridas)
- b) () Afecções respiratórias (tosse)
- c) () Ausência de afecções

OBS:

8.6 - ASSEIO PESSOAL (MÃOS LIMPAS, UNHAS CURTAS, ROUPAS LIMPAS, AUSÊNCIA DE ADORNOS NAS ORELHAS, PESCOÇO, PULSOS E MÃOS)

- a) () Bom
- b) () Regular
- c) () Ruim

OBS:

8.7 – VOCÊ RECEBEU ALGUM TIPO DE DIRECIONAMENTO PARA IMPLEMENTAÇÃO DAS BOAS PRÁTICAS DE FABRICAÇÃO (BPF) NA PRODUÇÃO DOS QMA? () Sim () Não

8.7.1 - De que forma foi esse direcionamento?

- a) () Treinamento
- b) () Palestra
- c) () Guia Técnico
- d) () Outro: _____

OBS:

8.7.2 - Qual o órgão ou instituição responsável por esse direcionamento?

9 – EQUIPAMENTOS E UTENSÍLIOS DIRETAMENTE RELACIONADOS AO PROCESSAMENTO

9.1 – FILTRAÇÃO DO LEITE

- | | |
|--|--|
| a) ☐ Tecido natural – algodão | c) ☐ Peneira plástica |
| b) ☐ Tecido artificial – volta ao mundo | d) ☐ Outro: _____ |

OBS:

9.2 – COAGULAÇÃO

- | | |
|--|---|
| a) ☐ Tambores plásticos | c) ☐ Fermenteira de aço inox |
| b) ☐ Latões | d) ☐ Outro: _____ |

OBS:

9.3 – MEXEDURA

- | | |
|---|---|
| a) ☐ Espátula de madeira | c) ☐ Lira de metal |
| b) ☐ Espátula de metal | d) ☐ Outro |

OBS:

9.4 – DESSORAGEM

- | | | |
|---|---|--|
| a) ☐ Tecido de algodão | b) ☐ Tecido de nylon | c) ☐ Outro: _____ |
|---|---|--|

OBS:

9.5 – BANCADA PARA MANIPULAÇÃO DA MASSA

- | | |
|-------------------------------------|--|
| a) ☐ Madeira | c) ☐ Aço inox |
| b) ☐ Ardósia | d) ☐ Outro: _____ |

OBS:

9.6 – FÔRMAS

- | | |
|--------------------------------------|--|
| a) ☐ Madeira | c) ☐ Aço inox |
| b) ☐ Plástico | d) ☐ Outro: _____ |

OBS:

9.7 – PRATELEIRAS DE MATURAÇÃO

- | | |
|-------------------------------------|-------------------------------------|
| a) ☐ Madeira | b) ☐ Ardósia |
|-------------------------------------|-------------------------------------|

c) () Aço inox

d) () Outro: _____

OBS:

10 – PROCESSOS DE LIMPEZA E SANIFICAÇÃO DOS EQUIPAMENTOS E UTENSÍLIOS DIRETAMENTE RELACIONADOS AO PROCESSAMENTO

10.1 – TANQUE DE FABRICAÇÃO

a) PRÉ-LAVAGEM () Sim () Não

b) LAVAGEM () Sim () Não

c) USO DE SANIFICANTES () Sim () Não

10.2 – BANCADA DE ENFORMAGEM E PRENSAGEM

a) PRÉ-LAVAGEM () Sim () Não

b) LAVAGEM () Sim () Não

c) USO DE SANIFICANTES () Sim () Não

OBS:

10.3 – PANOS E SACOS

a) PRÉ-LAVAGEM () Sim () Não

b) LAVAGEM () Sim () Não

c) USO DE SANIFICANTES () Sim () Não

OBS:

11 - PROCESSO

11.1 – TIPO DE FERMENTO UTILIZADO:

a) () Pingo

b) () Rala

c) () Nenhum

d) () Outro

Proporção: _____

11.2 – VOCÊ SEMPRE UTILIZOU ESSE FERMENTO?

() Sim

() Não

Se a resposta for NÃO, favor responder 11.2.1 e 11.2.2. Caso contrário, passe para 11.3.

11.2.1 - Desde quando passou a utilizar esse fermento? _____

11.2.2 - Por que passou a utilizar esse fermento? _____

11.3 – QUAL A PERIODICIDADE DE CONTAMINAÇÃO (“FERMENTAÇÃO”) DOS SEUS QUEIJOS?

- a) ☐ Nunca
b) ☐ ≤ 1 vez por semana
c) ☐ ≥ 1 vez por semana
d) ☐ Outro (indicar a periodicidade): _____

OBS:

11.4 – EM CASO DE CONTAMINAÇÃO DOS SEUS QUEIJOS, COMO VOCÊ OBTÊM O FERMENTO PARA PRÓXIMA PRODUÇÃO?

- a) ☐ Adquire do vizinho
b) ☐ Adquire da cooperativa/associação
c) ☐ Outro (especificar): _____

OBS:

11.5 – DESTINO DO QUEIJO “FERMENTADO”

- a) ☐ Faz quitanda
b) ☐ Vende mais barato
c) ☐ Outro: _____

OBS:

11.6 - TEMPO DE COAGULAÇÃO: _____

OBS:

11.7 – PRENSAGEM

- a) ☐ Somente com pressão das mãos
b) ☐ Prensagem com tecido
c) ☐ Outro

OBS:

11.8 – SALGA – TIPO DE SAL

- a) ☐ Sal grosso
b) ☐ Sal refinado

OBS:

11.9 – LAVAGEM FINAL DO PRODUTO

- a) ☐ Água
b) ☐ Soro
c) ☐ Leite

OBS:

11.10 - DESTINO DO SORO

- a) ☐ Alimentação de animais
b) ☐ Elaboração de outros produtos
c) ☐ Outro

OBS:

12 – EMBALAGEM

12.1 - TIPO DE EMBALAGEM

- a) ☐ Sem embalagem
b) ☐ Cry-o-vac
c) ☐ Outra

OBS:

12.2 – NA SUA OPINIÃO, A EMBALAGEM DO QMA É NECESSÁRIA? () Sim () Não

Por quê? _____

12.3 – OS QUEIJOS POSSUEM ALGUM NÚMERO DE IDENTIFICAÇÃO? () Sim () Não

Por quê? _____

13. OPINIÃO GLOBAL

13.1 - QUAL O SEU NÍVEL DE SATISFAÇÃO COM A ATIVIDADE QUEJEIRA?

a) () Muito satisfeito

c) () Indiferente

e) () Muito insatisfeito

b) () Satisfeito

d) () Insatisfeito

OBS:

13.2 – CONSIDERANDO A ÉPOCA EM QUE VOCÊ COMEÇOU A PRODUZIR QUEIJOS E OS DIAS ATUAIS,
HOVE ALGUMA ALTERAÇÃO EM ALGUMA ETAPA DO PROCESSAMENTO DO QMA? ()
Sim () Não

OBS:

Agradecemos sua colaboração!

ANEXO II - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

Prezado (a) voluntário (a),

Estamos realizando o estudo **“Impacto da Adoção das Boas Práticas de Fabricação e do Tempo de Maturação na Qualidade Microbiológica dos Queijos Minas Artesanais Produzidos nas Regiões do Serro e Serra da Canastra – MG”** e para isto gostaríamos de contar com sua ajuda. Sua participação incluirá o fornecimento das seguintes informações: nome, endereço, telefones, e-mail. Além disso, será aplicado um questionário a respeito dos produtores dos queijos, assim como aspectos relacionados à produção e comercialização dos mesmos.

Leia cuidadosamente o que segue e me pergunte sobre qualquer dúvida que você tiver. Após ser esclarecido (a) sobre as informações a seguir, no caso aceite fazer parte do estudo, assine ao final deste documento, que consta em duas vias. Uma via pertence a você e a outra ao pesquisador responsável. Em caso de recusa você não sofrerá nenhuma penalidade.

Declaro ter sido esclarecido sobre os seguintes pontos:

1. O trabalho tem por finalidade verificar a segurança microbiológica dos queijos artesanais produzidos nas regiões do Serro e da Canastra a partir de unidades registrados e adequados de acordo com a legislação vigente.
2. Ao participar desse trabalho estarei contribuindo para a caracterização dos queijos artesanais produzidos em minha unidade, bem como a confirmação de sua qualidade, garantindo dessa forma, que o produto possa estar sendo distribuído com total segurança aos consumidores.
3. Terei que doar para a realização dessa pesquisa, os seguintes materiais: amostras do leite e do pingo utilizados como matéria prima para a fabricação dos queijos e os queijos oriundos da minha produção no dia da coleta. Terei que responder um longo questionário, cuja recusa não me causará nenhum dano e nenhuma penalidade. A minha participação como voluntário deverá ter a duração de um ano, sendo que a visita e as coletas serão realizadas duas vezes ao ano.
4. Durante a execução do projeto poderão ocorrer riscos de constrangimento devido à coleta de informações de dados pessoais que serão atenuados com o devido sigilo de todos os dados informados. A coleta do material será realizada conforme procedimentos técnicos recomendados e usuais. Ao mesmo tempo estarei recebendo como benefícios pela minha participação os resultados referentes à pesquisa.
5. Os procedimentos aos quais serei submetido não provocarão danos morais, físicos, financeiros ou religiosos.
6. Não terei nenhuma despesa ao participar desse estudo.
7. Poderei deixar de participar do estudo a qualquer momento sem prejuízo do meu tratamento.
8. Meu nome será mantido em sigilo, assegurado assim a minha privacidade e se desejar, deverei ser informado dos resultados dessa pesquisa.

9. O sucesso deste trabalho dependerá de minha participação, mas esta é voluntária, dessa forma não receberei nenhuma remuneração.

O trabalho é de interesse científico e está sob responsabilidade da Professora Dra Célia Lúcia de Luces Fortes Ferreira, professora da Universidade Federal de Viçosa (UFV). Esse estudo foi avaliado e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da UFV. Qualquer transgressão das normas éticas, dúvidas ou solicitação de esclarecimentos, o(a) participante poderá recorrer a esse comitê, dirigindo-se a sua presidente: Patrícia Aurélia Del Nero, pessoalmente no endereço listado na última página deste documento, pelo telefone: (31) 3899-2492 ou pelo email: cep@ufv.br. Em qualquer dúvida ou solicitação de esclarecimento o (a) participante poderá entrar em contato com a equipe científica pelo telefone (31) 3899-3813 (Laboratório de Culturas Láticas da Universidade Federal de Viçosa).

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

Diante dos esclarecimentos prestados, concordo em participar do estudo
“Impacto da Adoção das Boas Práticas de Fabricação e do Tempo de Maturação na Qualidade Microbiológica dos Queijos Minas Artesanais Produzidos nas Regiões do Serro e Serra da Canastra – MG ”, na qualidade de voluntário (a).

Viçosa, ____ de ____ de ____

Assinatura do voluntário

Telefone:

e-mail:

Atenciosamente

Viviane da Cruz Rafael

Departamento de Tecnologia de Alimentos

vivicrafael@gmail.com

Telefones: (31) 3891-3545/ (31) 8832-6558

Responsáveis pela pesquisa:

Nome: Viviane da Cruz Rafael

Endereço: Avenida Peter Henry Rolfs, s/n, Campus Universitário – Viçosa (MG) – CEP: 36570-900– Departamento de Tecnologia de Alimentos (DTA)

Endereço particular: Rua Paris, 105, Santo Antônio, Viçosa (MG) - CEP: 36570-000.

Telefone: (31) 3899-3813

Telefone Particular: (31) 3891-3545 ou (31) 8832-6558

Nome: Érika Carla da Costa

Endereço: Avenida Peter Henry Rolfs, s/n, Campus Universitário – Viçosa (MG) – CEP: 36570-900– Departamento de Tecnologia de Alimentos (DTA)

Endereço particular: Rua Jorge Ramos, 80, ap 301, bloco 4, Santo Antônio, Viçosa (MG) - CEP: 36570-000.

Telefone: (31) 3899-3813

Telefone Particular: (31) 8748-1622 ou (31) 8748-1622

Nome: Célia Lúcia de Lucas Fortes Ferreira

Endereço: Avenida Peter Henry Rolfs, s/n, Campus Universitário – Viçosa (MG) – CEP: 36570-900 – Departamento de Tecnologia de Alimentos (DTA)

Endereço particular: Travessa Irmã Francisca, 31, ap903, Clélia Bernardes, Viçosa (MG) – CEP: 36570-000

Telefone: (31) 3899-2960

Telefone Particular: (31) 3899-1756 ou (31) 8881-6535

Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos (CEP)

Universidade Federal de Viçosa

Avenida Peter Henry Rolfs, s/n, Campus Universitário – Viçosa (MG) – CEP: 36570-900

Telefone: (31) 3899-2492

ANEXO III – Parecer consubstanciado do CEP



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Impacto das Boas Práticas de Fabricação e do Tempo de Maturação na Qualidade Microbiológica dos Queijos Minas Artesanais Produzidos nas Regiões do Serro e da Serra da Canastra - MG

Pesquisador: Célia Lúcia de Lucas Fortes Ferreira

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 27983614.0.0000.5153

Instituição Proponente: Departamento de Tecnologia de Alimentos

Patrocinador Principal: FUNDACAO DE AMPARO A PESQUISA DO ESTADO DE MINAS GERAIS

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 611.817

Data da Relatoria: 11/04/2014

Apresentação do Projeto:

Trata-se de um projeto de avaliação das condições microbiológicas e de segurança na produção de queijos, envolvendo unidades produtoras das regiões do Serro-MG e da Canastra-MG, que estejam cadastradas no IMA (Instituto Mineiro de Agropecuária).

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário: Verificar o impacto das Boas Práticas de Fabricação na qualidade microbiológica dos Queijos Minas Artesanais (QMA), caracterizar a produção dos mesmos em propriedades cadastradas nas regiões do Serro e da Serra da Canastra (MG), e determinar o tempo mínimo de maturação necessário para segurança de consumo.

Objetivos Secundários:

1 - Coletar informações sobre as características físicas, econômicas e sociais envolvendo as unidades produtoras de (QMA). 2 - Coletar informações sobre o processo de produção dos QMA das regiões do Serro e da Serra da Canastra, desde a obtenção do leite até o produto pronto. 3 - Salientar as maiores dificuldades e os pontos de deficiência no processo de obtenção de leite e fabricação dos queijos com qualidade. 4 - Determinar micro-organismos indicadores de qualidade em amostras de água, pingo e leite destinados a produção

Endereço: Universidade Federal de Viçosa, prédio Arthur Bernardes, piso inferior
Bairro: campus Viçosa **CEP:** 36.570-000
UF: MG **Município:** VICOSA
Telefone: (31)3899-2492 **Fax:** (31)3899-2492 **E-mail:** cep@ufv.br

Continuação do Parecer: 611.817

dos QMA das regiões do Serro e da Serra da Canastra, assim como no produto acabado em diversas fases de maturação. 5 - Determinar as características físico-químicas e microbiológicas nos QMA das regiões do Serro e da Serra da Canastra em diversas fases de maturação. 6 - Determinar o tempo mínimo de maturação dos QMA das regiões do Serro e da Serra da Canastra produzidos em propriedades cadastradas. 7 - Definir e listar, junto com os produtores, as práticas a serem seguidas nos cadernos de obrigações dos QMA a serem produzidos na sua região.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Adequadamente descritos.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Atende aos requisitos do CEP.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Atende aos requisitos do CEP.

Recomendações:

Nenhuma.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Nenhuma.

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

Ao término da pesquisa é necessária a apresentação do Relatório Final e após a aprovação desse, deve ser encaminhado o Comunicado de Término dos Estudos.

Projeto analisado durante a 2ª reunião de 2014.

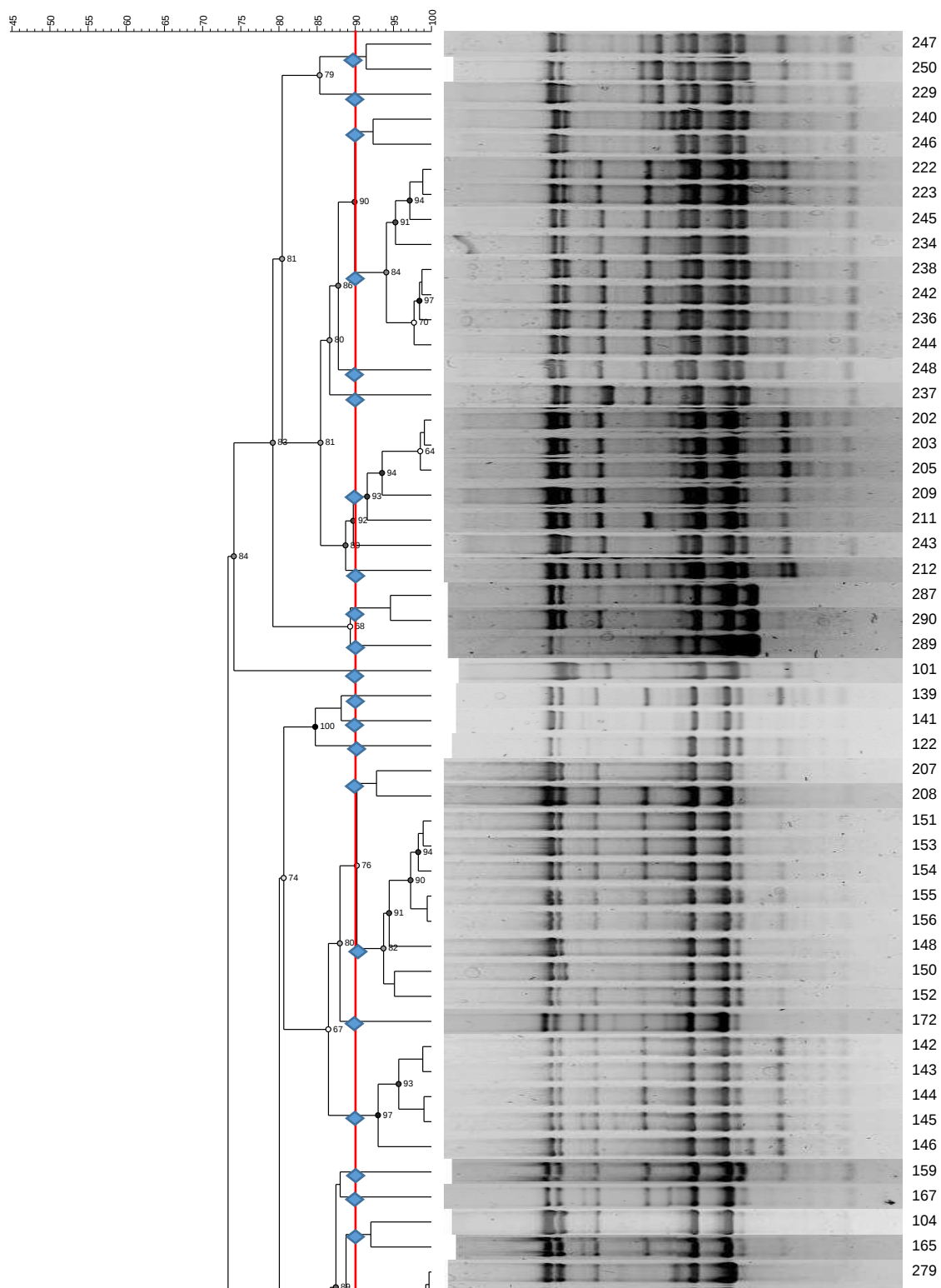
Endereço: Universidade Federal de Viçosa, prédio Arthur Bernardes, piso inferior
Bairro: campus Viçosa **CEP:** 36.570-000
UF: MG **Município:** VICOSA
Telefone: (31)3899-2492 **Fax:** (31)3899-2492 **E-mail:** cep@ufv.br

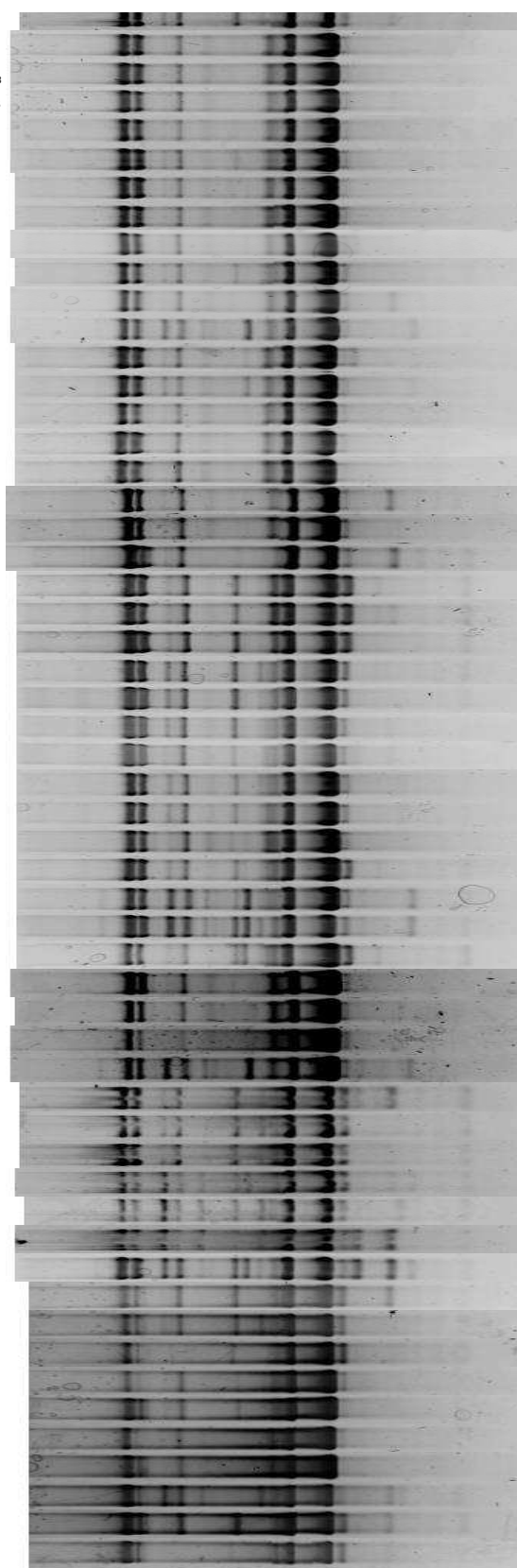
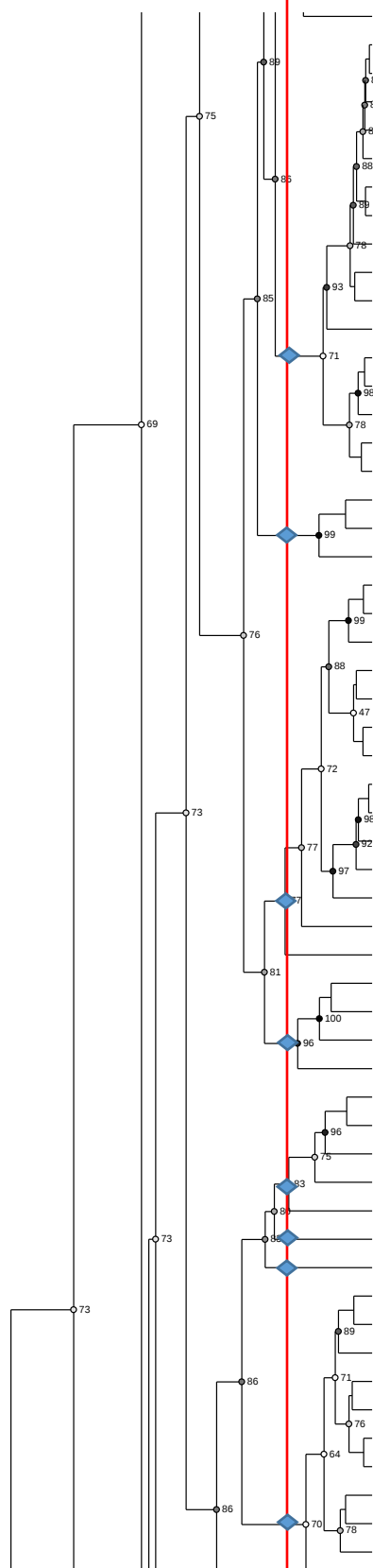
continuação do Parecer: 611.817

VICOSA, 10 de Abril de 2014

Assinador por:
Patrícia Aurélia Del Nero
(Coordenador)

ANEXO IV – Dendograma derivado da rep-PCR de bactérias do ácido láctico isoladas nos meios MRS e M17





165
279
280
281
278
277
275
276
284
274
283
282
272
273
271
267
268
285
286
206
252
254
255
261
263
265
266
258
259
257
253
256
260
251
296
298
294
291
164
166
163
160
169
161
269
135
170
249
264
270
178
262
220
241
149

