

**ÉDER GALINARI FERREIRA**

**CARACTERIZAÇÃO MICROSCÓPICA E MICROBIOLÓGICA DO  
BIOFILME DOS UTENSÍLIOS DE MADEIRA UTILIZADOS NA  
FABRICAÇÃO DE QUEIJO MINAS ARTESANAL DAS REGIÕES DO SERRO  
E CANASTRA**

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

**VIÇOSA  
MINAS GERAIS – BRASIL  
2011**

**ÉDER GALINARI FERREIRA**

**CARACTERIZAÇÃO MICROSCÓPICA E MICROBIOLÓGICA DO  
BIOFILME DOS UTENSÍLIOS DE MADEIRA UTILIZADOS NA  
FABRICAÇÃO DE QUEIJO MINAS ARTESANAL DAS REGIÕES DO SERRO  
E CANASTRA**

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

APROVADA: 05 de agosto de 2011.

---

Prof<sup>ª</sup>. Ana Clarissa dos Santos Pires

---

Prof. Clóvis Andrade Neves

---

Prof. Nélio José de Andrade  
(Coorientador)

---

Prof<sup>ª</sup>. Célia Lucia de Lucas Fortes Ferreira  
(Orientadora)

A minha família...  
... meu porto seguro.

*You can't always get what you want,  
But if you try sometimes, yeah,  
You just might find you get what you need!*  
(Rolling Stones)

## **Agradecimentos**

A Deus, por sempre iluminar meus caminhos.

Aos meus pais, Joaquim Alves Ferreira e Madalena Galinari Ferreira, pelo exemplo de dedicação, perseverança e educação.

As minhas irmãs Lucimar e Luciney e meu irmão Gilbert pelo carinho e apoio em todos os momentos.

As minhas sobrinhas e sobrinhos pelos ótimos momentos juntos.

A minha namorada Danielle Barbosa Morais pelo constante apoio e carinho.

A Universidade Federal de Viçosa e ao Departamento de Tecnologia de Alimentos pela oportunidade e confiança.

A CAPES pelo apoio financeiro da bolsa de Mestrado.

A professora Célia Lúcia de Luces Fortes Ferreira, pelas orientações e ensinamentos, que muito contribuíram para meu crescimento pessoal e acadêmico.

Aos professores Nélio José de Andrade e Mauro Mansur Furtado pela co-orientação e inestimáveis sugestões.

Aos professores Clóvis Andrade Neves e Ana Clarissa dos Santos Pires pela participação na banca de defesa.

Aos demais professores do Departamento de Tecnologia de Alimentos que muito contribuíram para meu amadurecimento.

Aos produtores rurais das regiões do Serro e da Canastra, por fornecer material para esta pesquisa e pela hospitalidade peculiar.

Ao funcionário da Cooperativa dos produtores rurais do Serro, Edvaldo, que algumas vezes nos conduziu até as fazendas.

Aos funcionários do Departamento de Tecnologia de Alimentos pela boa vontade.

Aos amigos do Laboratório de Culturas Lácticas da UFV, em especial, Juliana Escarião da Nóbrega e Tatiane Ferreira Araújo, pelo apoio na pesquisa.

Aos amigos de república pela convivência e apoio.

A todos que torceram e colaboraram comigo.

## **Biografia**

Éder Galinari Ferreira, filho de Joaquim Alves Ferreira e Madalena Galinari Ferreira, nasceu em 12 de março de 1981 na cidade de Ipatinga, Minas Gerais.

Iniciou a graduação em Licenciatura em Ciências Biológicas no Centro Universitário do Leste de Minas Gerais (UNILESTE-MG) na cidade de Coronel Fabriciano/MG em agosto de 2000. Durante o curso desenvolveu pesquisa com milho QPM e foi monitor da disciplina Bioquímica. Graduou-se em julho de 2004.

Em agosto de 2009 ingressou no curso de Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos no Departamento de Tecnologia de Alimentos da Universidade Federal de Viçosa, na cidade de Viçosa/MG. Trabalhou com biofilme formando nos utensílios de madeira utilizados para a fabricação do queijo Minas artesanal, sob a orientação da professora Célia Lúcia de Lucas Fortes Ferreira, defendendo a dissertação em agosto de 2011.

## Sumário

	<b>Página</b>
Resumo.....	vi
Abstract.....	ix
Introdução Geral.....	1
Hipóteses.....	3
Referências Bibliográficas.....	4
<b>CAPÍTULO I - IMPLICAÇÕES DA MADEIRA NA IDENTIDADE E SEGURANÇA DE QUEIJOS ARTESANAIS.....</b>	<b>6</b>
1. Introdução.....	8
2. A madeira na produção de alimentos.....	10
3. Biofilme: formação e características.....	11
4. Biofilmes na fabricação e segurança de queijos.....	14
5. Considerações Finais.....	16
<b>CAPÍTULO II - ASPECTOS MICROBIOLÓGICOS E ULTRA ESTRUTURA DO BIOFILME DE UTENSÍLIOS DE MADEIRA UTILIZADOS NA FABRICAÇÃO DO QUEIJO MINAS ARTESANAL DO SERRO E CANASTRA.....</b>	<b>22</b>
Resumo.....	23
Abstract.....	24
1. Introdução.....	25
2. Material e Métodos.....	26
2.1. Amostragem do Biofilme.....	26
2.2. Análises microbiológicas.....	27
2.3. Microscopia eletrônica de varredura.....	28
2.4. Análise dos Resultados.....	28
3. Resultados.....	28
3.1. Contagem de grupos relacionados à microbiota do queijo Minas artesanal.....	28
3.2. Enumeração de micro-organismos indicadores de segurança do queijo Minas artesanal.....	29
3.3. pH e umidade dos queijos.....	30
3.4. Ultra estrutura do biofilme dos utensílios.....	30
4. Discussão.....	31
5. Referências.....	34
Conclusões Gerais.....	44

## Resumo

FERREIRA, Éder Galinari. M.Sc. Universidade Federal de Viçosa, agosto de 2011. **Caracterização microscópica e microbiológica do biofilme dos utensílios de madeira utilizados na fabricação de queijo Minas artesanal das regiões do Serro e Canastra.** Orientadora: Célia Lúcia de Luces Fortes Ferreira. Co-orientadores: Mauro Mansur Furtado e Nélio José de Andrade.

Devido a inexistência de estudos sobre a composição dos biofilmes formados nos utensílios de madeira utilizados na fabricação do queijo Minas artesanal, o objetivo dessa pesquisa foi de caracterizar microscópica e microbiologicamente os biofilmes das formas, mesas e prateleiras de madeira das regiões do Serro e Canastra. Amostras para avaliação do biofilme foram removidas das superfícies de três formas, seis mesas e quatro prateleiras da região do Serro e três mesas e três prateleiras da região da Canastra. O número de amostras coletadas corresponde a quase a totalidade de utensílios de madeira ainda em uso nas duas regiões, uma vez que esses utensílios foram abolidos pela Lei Estadual nº 14.185 de 31 de janeiro de 2002. Utilizou-se o método do *swab*, delimitando a área de amostragem com molde esterilizado de 100 cm<sup>2</sup> para as mesas e prateleiras e 4 cm<sup>2</sup> para as formas. Nas mesas, coletaram-se três amostras de 100 cm<sup>2</sup>, sendo uma no centro e outras duas em suas extremidades. Os três pontos foram plaqueados separadamente para obtenção da média. Na prateleira coletou-se uma amostra de 100 cm<sup>2</sup>. Em cada forma, foram coletados quatro pontos utilizando-se o mesmo *swab*, totalizando uma área de 16 cm<sup>2</sup>. Amostras de leite, fermento endógeno e queijo maturado também foram obtidas, sendo cinco amostras de leite, quatro de fermento e três de queijo do Serro. Na Canastra foram avaliadas três amostras de leite, três de fermento e três de queijo. As amostras foram plaqueadas em profundidade nos meios *Plate Count Agar* (mesófilos aeróbios totais), *Potato Dextrose Agar* (leveduras), MRS em anaerobiose (lactobacilos mesofílicos), M17 em aerobiose (*Lactococcus* spp.) e placas Petrifilm<sup>®</sup> específicas para *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e coliformes a 32 °C. Nos queijos maturados avaliou-se ainda a presença de *Salmonella* sp. e *Listeria* sp. utilizando-se kits Reveal<sup>®</sup> Neogen, que envolvem etapa de pré-enriquecimento. Fragmentos dos utensílios de madeira foram obtidos para a avaliação em microscopia eletrônica de varredura. Dos queijos avaliados, somente uma amostra do Serro apresentou contagens de *S. aureus* e coliformes a 32 °C acima dos padrões de legislação. Na Canastra, duas amostras de queijo superaram os níveis vigentes para *E. coli* e coliformes a 32 °C, e somente uma amostra de leite permaneceu abaixo dos

padrões para essas contagens. Por outro lado, uma amostra de fermento do Serro ultrapassou os limites para *E. coli* e coliformes a 32 °C e duas ultrapassaram os limites para *S. aureus*. Amostras de fermento endógeno da Canastra permaneceram dentro dos padrões estabelecidos nessa pesquisa. A maioria dos utensílios do Serro apresentou contagens abaixo dos limites propostos nesse estudo mesmo quando altas contagens de patógenos foram observadas nas amostras de leite e fermento, indicando a importância da acidez mais elevada dos queijos dessa região. O oposto foi verificado nos utensílios da Canastra, estando apenas as prateleiras com média abaixo do estipulado para *E. coli*. Verificou-se ausência de *Salmonella* sp. e *Listeria* sp. em todos os queijos maturados. Contagens elevadas das bactérias do ácido láctico *Lactobacillus* spp. mesofílicos e *Lactococcus* spp. foram constatadas nos utensílios de madeira de ambas as regiões. Essas bactérias são essenciais para a maturação do queijo e auxiliam no controle de micro-organismos indesejáveis, garantindo a segurança do produto. Além de cocos e bacilos, leveduras e fungos filamentosos também foram observados nas fotomicrografias eletrônicas, demonstrando a diversidade existente nesses biofilmes. Os resultados desse estudo sugerem que a tecnologia empregada e os menores níveis de contaminação da matéria-prima são determinantes para a qualidade do produto final. Dessa forma, torna-se importante a aplicação e manutenção das boas práticas de fabricação em todas as etapas do processamento do queijo, para garantir um produto seguro e, ainda assim, com as características tradicionais do queijo Minas artesanal mantidas.

## Abstract

FERREIRA, Éder Galinari. M.Sc. Universidade Federal de Viçosa, august of 2011. **Microscopic and microbiologic characterization of wooden utensils biofilm used in artisanal Minas cheese making from Serro and Canastra regions.** Advisor: Célia Lúcia de Luces Fortes Ferreira. Co-advisors: Mauro Mansur Furtado and Nélio José de Andrade.

Due to inexistence of studies on the composition of biofilms formed in the wooden utensils used in the manufacture of artisanal Minas cheese, the aim of this study was to characterize microscopical and microbiologically the biofilm on wooden forms, tables and shelves from Serro and Canastra regions. To evaluate the biofilm samples were removed from the surfaces of three forms, six tables and four shelves in the region of Serro and three tables and three shelves in the region of Canastra. The number of samples corresponds to almost the totality of wooden utensils still in use in both regions, since these utensils have been abolished by the State Law No. 14,185 of January 31, 2002. We used the swab method, limiting the sampling area with sterile template of 100 cm<sup>2</sup> for the tables and shelves and 4 cm<sup>2</sup> for the forms. At the tables, were collected three samples of 100 cm<sup>2</sup>, with one at center and two at their extremities. The three points were plated separately to obtain the average. We collected on the shelf a sample of 100 cm<sup>2</sup>. In each form, four points were collected using the same swab, totaling an area of 16 cm<sup>2</sup>. Samples of milk, endogenous culture and cheese ripened were also obtained, being five samples of milk, four of endogenous culture and three of cheese in Serro. In Canastra we evaluated three samples of milk, three of endogenous culture and three of cheese. The samples were plated in depth in the media Plate Count Agar (total aerobic mesophiles), Potato Dextrose Agar (yeast), MRS in anaerobic conditions (mesophilic *Lactobacillus* spp.), M17 in aerobic conditions (*Lactococcus* spp.) and specific Petrifilm<sup>®</sup> plates for *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* and coliforms at 32 °C. Ripened cheeses were evaluated also the presence of *Salmonella* sp. and *Listeria* sp. using Reveal kits (Neogen<sup>®</sup>), that involves a pre-enrichment step. Fragments of wooden utensils were obtained for biofilm evaluation in scanning electron microscopy. Of the cheeses tested, only one sample from Serro had counts of *S. aureus* and coliforms at 32 °C above standards legislation. In Canastra, two cheese samples exceeded current levels for *E. coli* and coliforms at 32 °C, and only one milk sample remained below the standards for these counts. On the other hand, a sample of endogenous culture from Serro exceeded the limits for *E. coli* and coliforms at 32 °C and two exceeded the limits for *S. aureus*. Samples of endogenous culture from

Canastra remained within the standards established in this research. Most of the utensils from Serro had counts below the limits proposed in this study even when high numbers of pathogens were observed in samples of milk and endogenous culture, indicating the importance of the higher acidity of the cheese in this region. The opposite was seen in utensils of Canastra, with only the shelves below the mean established for *E. coli*. There was no *Salmonella* sp. and *Listeria* sp. in all ripened cheeses. High counts of lactic acid bacteria mesophilic *Lactobacillus* spp. and *Lactococcus* spp. were found in wooden utensils in both regions. These bacteria are essential for the maturation of the cheese and help to control undesirable microorganisms, ensuring product safety. In addition to cocci and bacilli, yeasts and filamentous fungi were also observed in the electronic photomicrographs, demonstrating the diversity of these biofilms. The results of this study suggest that the technology employed and the lowest levels of contamination of raw materials are essential to the quality of the final product. Thus, it is important to the implementation and maintenance of good manufacturing practices at all stages of the cheese processing, to ensure a safe product and yet, with the traditional characteristics of artisanal Minas cheese kept.

## **Introdução Geral**

O queijo Minas artesanal é um produto tradicional do Estado de Minas Gerais fazendo parte de uma cultura adquirida há mais de 200 anos e cuja tradição é repassada entre as gerações. Até 2010, esse queijo era reconhecidamente produzido nas cinco principais regiões: Araxá, Cerrado, Serro, Canastra e mais recentemente Campo das Vertentes. A partir de janeiro de 2011 foi proposta a Lei Estadual nº 19.492 que estabelece a permissão da produção desse queijo nos mais de 600 municípios do Estado (Minas Gerais, 2011), o que elevará a sua produção a números superiores aos atuais 29 mil toneladas, produzidas nas cinco principais regiões (EMATER, 2004).

Dentre as regiões produtoras do queijo Minas artesanal o Serro e a Canastra se destacam pela elaboração de queijos marcadamente distintos, em relação às características sensoriais. As técnicas empregadas nas duas regiões são ligeiramente diferentes quanto à etapa de enformagem. Na região do Serro a coalhada é prensada manualmente no interior das formas, já na Canastra a coalhada é colocada no interior de tecidos que são torcidos manualmente, deixando o queijo inicialmente com um menor teor de umidade. Por esse motivo, os tempos de maturação à temperatura ambiente, dos queijos dessas regiões são diferentes, 17 dias para Serro (Martins, 2006) e 22 dias para Canastra (Dores, 2007). Como esse queijo artesanal é produzido a partir do leite cru de vaca adicionado de coalho e fermento endógeno “pingo”, utiliza-se do processo de maturação para diminuir os níveis de patógenos e deterioradores e melhorar as características sensoriais únicas desse produto, aumentando seu valor agregado.

No processo de fabricação do queijo Minas artesanal a coalhada entra em contato com as formas e as mesas (bancadas) de madeira durante a enformagem e prensagem manual, permanecendo em prateleiras de madeira durante a maturação. O acúmulo de resíduos nesses utensílios, dentre eles, proteínas, carboidratos e outros componentes presentes no leite, permite a formação de uma matriz microbiana complexa denominada biofilme (Trulear e Characklis, 1982; Capdeville e Nguyen, 1990).

Com a elaboração da Portaria Estadual nº 518, de 14 de junho de 2002 (Minas Gerais, 2002) que dispõe sobre os requisitos básicos das instalações, materiais e equipamentos para a fabricação do queijo Minas artesanal, os produtores se adequaram às normas de boas práticas de fabricação, o que resultou na retirada das formas e mesas de madeira, que foram substituídas por formas de polipropileno no Serro e polietileno

de alta densidade na Canastra e as mesas por ardósia ou aço inoxidável, com o objetivo de melhorar a qualidade do produto final. Entretanto, essa modificação da superfície no qual o queijo é produzido, ocasionou alterações nas características dos queijos, que foram percebidas pelos produtores. A madeira com seu biofilme têm sido indicados como responsáveis por características próprias de determinados produtos artesanais, como vinagres (Solieri e Giudici, 2008), cidras (Del Campo et al., 2003) e queijos com Denominação de Origem Protegida, como por exemplo, o Ragusano (Lortal et al., 2009) e Reblochon de Savoie (Mariani et al., 2007).

No processo tradicional, o queijo Minas artesanal é colocado em prateleira de madeira, ainda permitida pela legislação, para maturação. Durante esse período, o queijo passa por diferentes processos físico-químicos como redução do pH (Beuchat e Golden, 1989), diminuição do potencial de oxi-redução (Crow et al., 1995) e diminuição da atividade de água (Brown, 1976), que auxiliam na inocuidade do produto a ser consumido dentro dos padrões estabelecidos. Além da influência das condições ambientais, tais processos ocorrem devido à atividade de leveduras e bactérias do ácido láctico, que em diferentes momentos, produzem enzimas, ácidos orgânicos e outros compostos antimicrobianos como peptídeos bioativos e bacteriocinas que controlam os níveis de patógenos e aumentam a segurança do produto (González et al., 2007).

Por isso, a enumeração e a caracterização dos micro-organismos existentes nos biofilmes dos utensílios de madeira permite uma melhor compreensão do seu papel no desenvolvimento das características peculiares do queijo Minas artesanal, bem como, sua atuação na segurança do produto. Além disso, os resultados dessa pesquisa fornecerão apoio científico para a elaboração de novas legislações que possibilitem a utilização de utensílios de madeira na fabricação de alimentos artesanais.

## Hipóteses

- 1- O biofilme reflete a qualidade microbiológica das matérias-primas e os níveis de higienização dos utensílios de madeira empregados na fabricação do queijo Minas artesanal.
- 2- O biofilme é fonte de bactérias do ácido láctico que podem exercer um papel na segurança dos queijos artesanais.

Essas hipóteses foram testadas por:

- 1- Determinação de indicadores de segurança e de qualidade sanitária nos leites, fermentos endógenos “pingo”, biofilmes das formas, mesas e prateleiras de madeira e em queijos maturados (*Salmonella* sp., *Listeria* sp., *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e coliformes a 32 °C);
- 2- Determinação dos níveis de *Lactobacillus* spp. mesofílicos (MRS) e *Lactococcus* spp. (M17) nas matérias-primas, biofilmes dos utensílios de madeira e queijos maturados.
- 3- Determinação da ultra estrutura do biofilme das formas, mesas e prateleiras.

## Referências Bibliográficas

- Beuchat, L. R. & Golden, D. A. Antimicrobials occurring naturally in foods. **Food Technology**. v. 43, p. 134-142, 1989.
- Brown, A. D. Microbial water stress. **Bacteriological Reviews**. v. 40, p. 803-846, 1976.
- Capdeville, I. & Nguyen, K. M. Kinetics and modelling of aerobic and anaerobic film growth. **Water Science and Technology**. v. 22, p. 149-170, 1990.
- Crow, V. L., Coolbear, T., Gopal, P. K., Martley, F. G., McKay, L. L. & Riepe, H. The role of autolysis of lactic acid bacteria in the ripening of cheese. **International Dairy Journal**. v. 5, n. 8, p. 855-875, 1995.
- Del Campo, G., Santos, J. L., Berregi, I., Velasco, S., Ibarburu, I., Dueñas, M. T. & Irastorza, A. Ciders produced by two types of presses and fermented in stainless steel and wooden vats. **Journal of the Institute of Brewing**. v. 109, n. 4, p. 342-348, 2003.
- Dores, M. T. **Queijo Minas artesanal maturado à temperatura ambiente e sob refrigeração**. 2007. 103f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos)-Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 2007.
- EMATER. Queijo Minas Artesanal: Tradição e Qualidade que Revelam Minas. **Revista da EMATER – MG**, Belo Horizonte, Ano XXII – n. 80. Agosto de 2004. p. 8-9.
- 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, p. 716-722, 2007.
- Lortal, S., Di Blasi, A., Madec, M. N., Pediliggieri, C., Tuminello, L., Tanguy, G., Fauquant, J., Lecuona, Y., Campo, P., Carpino, S. & Licitra, G. Tina wooden vat biofilm: A safe and highly efficient lactic acid bacteria delivering system in PDO Ragusano cheese making. **International Journal of Food Microbiology**. v. 132, p. 1-8, 2009.
- Mariani, C., Briandet, R., Chamba, J.-F., Notz, E., Carnet-Pantiez, A., Eyoug, R. N. & Oulahal, N. Biofilm Ecology of Wooden Shelves Used in Ripening the French Raw Milk Smear Cheese Reblochon de Savoie. **Journal of Dairy Science**. v. 90, p. 1653-1661, 2007.
- Martins, J. M. **Características físico-químicas e microbiológicas durante a maturação do queijo Minas artesanal da região do Serro**. 2006. 146f. Tese

(Doutorado em Tecnologia de Alimentos)-Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 2006.

Minas Gerais. 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. Disponível em: <<http://www.ima.mg.gov.br/component/search/?searchword=portaria+518&ordering=&searchphrase=all>>. Acesso: 04 jul, 2011.

Minas Gerais. Lei nº 19.492, de 13 de Janeiro de 2011. Altera dispositivos da Lei nº 14.185, de 31 de janeiro de 2002, que dispõe sobre o processo de produção do Queijo Minas Artesanal e dá outras providências. 2011. Disponível em: <[http://www.fiscolex.com.br/doc\\_19125305\\_LEI\\_N\\_19\\_492\\_13\\_JANEIRO\\_2011.aspx](http://www.fiscolex.com.br/doc_19125305_LEI_N_19_492_13_JANEIRO_2011.aspx)> Acesso em: 04 jul, 2011.

Solieri, L. & Giudici, P. Yeasts associated to Traditional Balsamic Vinegar: Ecological and technological features. **International Journal of Food Microbiology**. v. 125, p. 36-45, 2008.

Trulear, M. G. & Characklis, W. G. Dynamics of biofilm processes. **Journal of Water Pollution Control Federation**. v. 54, p. 1288-1301, 1982.

## **CAPÍTULO I**

### **IMPLICAÇÕES DA MADEIRA NA IDENTIDADE E SEGURANÇA DE QUEIJOS ARTESANAIS**

Artigo de revisão aceito para publicação na Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes nº 381, v. 66 de julho/agosto de 2011.

## **Implicações da madeira na identidade e segurança de queijos artesanais**

### ***Implications of wood in artisanal cheese identity and safety***

#### **Resumo**

A madeira é secularmente utilizada na manufatura dos utensílios empregados na fabricação de alimentos artesanais, como por exemplo, tonéis de fermentação de bebidas alcoólicas, tinas, formas, prateleiras e bancadas para produção de queijos. Essas superfícies apresentam estrutura porosa, o que permite o desenvolvimento de comunidades microbianas conhecidas como biofilmes. Fungos filamentosos, leveduras e bactérias do ácido acético e láctico (BAL) presentes nesses biofilmes são responsáveis pelas características peculiares de alimentos como cidras, vinhos, vinagres e de uma gama variada de queijos artesanais, garantindo sabores e aromas característicos desses alimentos, assim como sua segurança. Pesquisas recentes demonstraram que a presença de BAL, em biofilmes, diminuiu a adesão de patógenos como *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*, principais indicadores de práticas de fabricação insatisfatórias em ambientes de produção de alimentos. Em 2002, a legislação criada para a fabricação do queijo Minas artesanal, estabeleceu padrões físico-químicos e microbiológicos para a elaboração desses queijos, e eliminou o uso das formas e bancadas de madeira, como uma medida para cercear a proliferação de patógenos nesses produtos. Essa medida foi preventiva e emergencial, embora ainda hoje questionada pelos produtores tradicionais, conhecedores das práticas utilizadas em países da Europa, onde a madeira tem um papel importante nas características de vários produtos artesanais, especialmente em alguns tipos de queijos com Denominação de Origem Protegida (DOP). Essa revisão tem como objetivo reunir informações relacionadas ao papel da madeira na produção de alimentos, assim como dos biofilmes nela formados e da função dos mesmos nas características e segurança de queijos artesanais

**Palavras-chave:** Biofilme; Utensílios de madeira; Queijo Minas artesanal; Alimentos seguros.

#### **Abstract**

The wood is secularly used in the manufacture of utensils used in artisanal food manufacturing, such as barrels of alcoholic fermentation, vats, moulds, shelves, and tables for cheese making. These surfaces have porous structure, which allows the development of microbial communities known as biofilms. Biofilm is a safe way for

growing of desirable micro-organisms, including yeasts, molds and lactic acid bacteria (LAB). They act on acid production and development of *flavor* in foods. However, pathogens are also constantly present in food biofilm and constitute a health risk for consumers. Nevertheless, recent studies have shown that the presence of LAB in biofilms decreased the adhesion of pathogens such as *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*, the main indicators of unsatisfactory manufacturing practices in food environments. In 2002 legislation was established for the manufacture of artisanal Minas cheese, which physico-chemical and microbiological standards were established, prohibiting the use of wooden moulds and tables. This measure was preventive and emergency, though still questioned by the traditional producers, who know the practices used in European countries, where the wood has an important role in the characteristics of various artisanal products, especially some types of cheese with Protected Designation of Origin. To this purpose, studies are needed relating to technology, environmental action and the final characteristics of the product. This includes research to check the real role of wooden utensils in traditional characteristics of the cheeses.

**Key words:** Biofilm; Wooden utensils; Artisanal Minas cheese; Safe food.

## 1. Introdução

A produção de queijo em muitas situações constitui uma atividade familiar sendo comum a característica de sustentabilidade em diferentes tipos de comunidades. Devido a essa característica, as tecnologias envolvidas são repassadas para as gerações mais novas passando às vezes a fazer parte da riqueza de determinadas regiões, e tanto a tecnologia empregada quanto as características do produto se transformam em “saberes relacionados a um determinado ambiente/território”. Essa tradição e as características únicas de produtos de determinadas regiões sempre foram valorizadas no continente europeu. Atualmente, verifica-se um crescente interesse nesses alimentos no resto do mundo, pois, além de manter a tradição, os produtos tradicionais também são valorizados economicamente, o que contribui para a manutenção dos produtores em regiões específicas, diminuindo o êxodo para os centros urbanos. Nos últimos anos, e principalmente com o estabelecimento da União Européia (UE), verificou-se na valorização dos alimentos regionais/tradicionais/artesanais um nicho econômico importante além de uma estratégia para aumentar a qualidade desses produtos (EMATER, 2004; MARTINS, 2006; TREGGAR et al., 2007). Na UE, esses alimentos

recebem selos especiais diferenciando-os de produtos semelhantes comercializados num mesmo mercado. Pelo fato de haver legislações específicas para a comercialização no país e entre os diferentes países da UE, a preocupação com a qualidade passou a ser um fator imprescindível para a comercialização de tais produtos. Dessa forma, a valorização de produtos tradicionais está aliada a uma tendência moderna que pode ser vista também como uma alternativa interessante para melhorar a qualidade dessa fatia de alimentos da agroindústria.

O conceito de preservação da diversidade tradicional de alimentos surgiu em 1883, em Paris, como “Appellation d’Origin Côtrolée” (AOC) garantindo a autenticidade de alimentos produzidos numa região particular. Posteriormente, o termo evoluiu para Denominação de Origem Protegida (DOP) sendo aplicado a alimentos produzidos, processados e/ou preparados em uma determinada área geográfica (BERTOZZI & PANARI, 1993). Na Europa, vários alimentos tradicionais possuem o *status* DOP, dentre os quais um grande número de queijos, como por exemplo, o Pecorino Sardo (MADRAU et al., 2006), Stilton (GKATZIONIS et al., 2009), Manchego (POVEDA et al., 2004), Parmigiano Reggiano (GALA et al., 2008), Comté (MAAS et al., 2010), para citar alguns.

No Brasil, o Estado de Minas Gerais é o maior produtor de queijos artesanais, com produção anual superior a 29 mil toneladas, sendo estas provenientes de 63 municípios pertencentes a cinco principais regiões produtoras (Serro, Araxá, Cerrado, Canastra e Campo das Vertentes). Nessas regiões o impacto econômico é considerável gerando quase 27 mil empregos diretos (EMATER-MG, 2009 – Informação pessoal), sendo que esta produção tende a aumentar, visto que em janeiro de 2011 foi regulamentada pela Lei Estadual nº 19.492, permitindo que todos os municípios de Minas Gerais produzam o queijo Minas artesanal. No entanto, a precariedade dos produtos disponibilizados até início da década de 2000 era notória e grande parte da produção constituía um comércio clandestino. A Lei Estadual nº 14.185, de 31 de janeiro de 2002 (MINAS GERAIS, 2002a) regularizou os queijos advindos de propriedades credenciadas, que se adequaram às exigências das normas de boas práticas de fabricação (BPF). Ao mesmo tempo, estudos foram imediatamente iniciados para a caracterização físico-química, microbiológica e das tecnologias empregadas nas quatro principais regiões, assim como para a definição do período mínimo de maturação desses queijos para que pudesse ser colocado um produto seguro para o consumidor no mercado (MARTINS, 2006; PINTO et al., 2009). Para a adequação imediata das unidades produtoras, medidas foram tomadas para diminuir os índices de contaminação

desses queijos. Dentre essas, a adequação física das salas de produção do queijo, a implementação das boas práticas agropecuárias (BPA) com vistas à obtenção de um leite com qualidade e treinamento dos produtores para o estabelecimento das BPF, com vistas à sua auto valorização e valorização de seu produto. As normas para a fabricação dos queijos artesanais foram estabelecidas e dentre elas, a proibição da fabricação dos queijos empregando-se as tradicionais mesas e formas de madeira (MINAS GERAIS, 2002b). Essa medida foi preventiva e emergencial, embora ainda hoje questionada pelos produtores tradicionais, conhecedores das práticas utilizadas em países da Europa, onde a madeira tem um papel importante nas características de vários produtos artesanais, principalmente nas características de alguns tipos de queijos (LORTAL et al., 2009).

Essa revisão teve como finalidade avaliar o papel da madeira na produção de alimentos e os princípios envolvidos na formação de biofilmes na manutenção das características dos produtos e de sua segurança, com ênfase em queijos.

## **2. A madeira na produção de alimentos**

Historicamente, a madeira é utilizada na manufatura de utensílios e equipamentos empregados na produção de alimentos. Diferentes bebidas artesanais e tipos de queijos em alguma fase de seu processamento entram em contato com a madeira, como por exemplo, cidras fermentadas e os queijos Calenzana, Reblochon de Savoie e Ragusano (SWAFFIELD et al., 1997; MARIANI et al., 2007; CASALTA et al., 2009; LORTAL et al., 2009).

A cidra artesanal é fabricada em tonéis de madeira e seu uso tem sido reportado como desejável (SWAFFIELD et al., 1997). A superfície porosa da madeira garante a permanência de leveduras e bactérias do ácido láctico (BAL), responsáveis pela produção de *flavor* no produto. Os produtores artesanais de cidra têm rechaçado a possibilidade do uso de tonéis de aço inoxidável pelo fato deste comprometer suas características, pela ausência da comunidade microbiana presente em biofilmes que mantêm as propriedades sensoriais específicas do produto. A madeira está também presente na produção do “vinagre”, onde micro-organismos nos biofilmes dos tonéis de fermentação atuam na bioconversão do etanol em ácido acético (SOLIERI & GIUDICI, 2008).

Na produção do queijo Ragusano o leite cru entra em contato com o biofilme existente no interior de tinas de madeira. Esse biofilme é um eficiente meio de inoculação de BAL – incluindo *Lactococcus lactis* (*L. lactis*), *Streptococcus thermophilus* (*S. thermophilus*) e lactobacilos termofílicos (LORTAL et al., 2009). O

queijo Calenzana também é produzido a partir de leite cru e sem a utilização de cultura *starter*, sendo maturado em arcos de madeira cujo biofilme formado tem, de alguma forma, um papel nas características conhecidas desse queijo (CASALTA et al., 2009). Reblochon de Savoie é um queijo também produzido com leite cru sendo maturado em prateleiras de madeira por um período de pelo menos, quinze dias. Hipotetiza-se que a presença de espécies dos gêneros *Leuconostoc*, *Enterococcus*, *Pseudomonas*, *Staphylococcus* e de lactobacilos heterofermentativos identificadas nessas prateleiras se relacionam à segurança desses queijos (MARIANI et al., 2007).

Verifica-se, portanto, que várias das espécies microbianas identificadas em biofilmes presentes em mesas e prateleiras de madeira já foram extensamente estudadas como tendo um papel na produção, nas características sensoriais e nutricionais de produtos lácteos. De um modo geral, *L. lactis*, *Lactococcus cremoris* (*L. cremoris*), *Lactobacillus bulgaricus* (*L. bulgaricus*) e *S. thermophilus* dentre outras, contribuem para uma formação rápida de ácido e produção de aroma em produtos lácteos, incluindo vários tipos de queijos (DIAS & WEIMER, 1998). Além do aspecto de segurança, a presença de determinados micro-organismos presentes nesses biofilmes como *S. thermophilus*, contribuem para o aspecto nutricional pelo acúmulo de vitaminas do complexo B nos produtos, como por exemplo, ácido fólico (RAO & SHAHANI, 1987; CRITTENDEN et al., 2003), substância essencial para a correta formação do tubo neural de fetos e desenvolvimento do sistema nervoso em recém-nascidos. Quanto ao aspecto tecnológico, além da produção de ácido láctico, a produção de ácido fólico por estirpes de *S. thermophilus* estimula o crescimento de *L. bulgaricus*, favorecendo o acúmulo de *flavor* nos produtos (VAN HYLCKAMA Vlieg & HUGENHOLTZ, 2007), sendo, portanto, desejável a sua presença nos biofilmes das formas, mesas e prateleiras de madeira.

### **3. Biofilme: formação e características**

Biofilme é uma comunidade microbiana séssil, caracterizada por células irreversivelmente aderidas a um substrato ou interface, e incorporadas em uma matriz polimérica extracelular produzida por micro-organismos que apresentam características alteradas em relação às taxas de crescimento, de transcrição de genes e à sensibilidade a sanitizantes (DONLAN & COSTERTON, 2002). Essa matriz é comumente constituída por exopolissacarídeos (EPS), lipídeos, proteínas e DNA extracelular, que direcionam as características do biofilme como porosidade, densidade, umidade, carga elétrica da

superfície, propriedades de sorção, hidrofobicidade e estabilidade mecânica (FLEMMING et al., 2007).

Embora em algumas situações a presença de biofilmes seja indesejável, a sua presença e composição é imprescindível na bioconversão de matéria orgânica como naqueles formados em biorreatores de estações de tratamento de esgoto transformando material nocivo em substâncias inócuas (WU et al., 2006) e na proteção da madeira, onde por exemplo, um biofilme de *Aureobasidium pullulans* produz uma película auto-regenerativa contra a ação da chuva, altas temperaturas e radiação UV, sem no entanto, degradar a madeira (SAILER et al. 2010). Em alimentos, são importantes os biofilmes formados por bactérias e leveduras que estão presentes nos tonéis de fermentação feitos de madeira, e que promovem a bioconversão do etanol em ácido acético (SOLIERI & GIUDICI, 2008) e contribuem para a fermentação e produção de *flavor* característico da cidra artesanal (SWAFFIELD et al., 1997), e aqueles formados em tinas de madeira utilizada na fabricação de queijos (LORTAL et al., 2009), e nas prateleiras de maturação (DIAS & WEIMER, 1998, MARIANI et al., 2007, GKATZIONIS et al., 2009).

O início da formação de um biofilme é marcado pela deposição de matéria orgânica sobre a superfície que será colonizada, sendo essa fase, um pré-requisito para a ligação microbiana posterior. A aderência ocorre em maior ou menor velocidade de acordo com a carga da superfície. Em superfícies hidrofóbicas, a adesão ocorre mais rapidamente do que em superfícies hidrofílicas. Outros fatores como: a natureza e a concentração dos nutrientes disponíveis, proteínas, lipídios, fosfolipídios, carboidratos, sais minerais e vitaminas (TRULEAR & CHARCKLIS, 1982; CAPDEVILLE & NGUYEN, 1990), a fase em que o micro-organismo se encontra, a presença de apêndices celulares e substâncias poliméricas produzidas, têm papel importante na velocidade da adesão (ARAÚJO et al., 2009). Além disso, a rugosidade do material pode ser um fator favorável para aumentar a aderência dos micro-organismos (APILÁNEZ et al., 1998).

A hidrofobicidade é a característica físico-química mais relevante no processo de adesão microbiana à superfície e varia de acordo com a quantidade de água no meio. Em bactérias Gram-negativas, a hidrofobicidade aumenta à medida que a água no meio diminui, pois estas possuem maior quantidade de lipídeos em sua membrana. Por outro lado, bactérias Gram-positivas são menos influenciadas pela alteração do volume de água no meio em decorrência da maior quantidade de peptidoglicano em suas membranas e menor quantidade de lipídeos (STREVETT & CHEN, 2003). Espécies

bacterianas com diferentes constituintes da parede celular apresentam diferentes interações com as superfícies e, conseqüentemente, diferentes velocidades de adesão (CHEN & ZHU, 2005).

A hidrofobicidade de um material é expressa como a energia livre de interação – energia livre de Gibbs ( $\Delta G$ ) entre as moléculas de uma superfície (S) imersa em água (A). Quando  $\Delta G_{SAS}^{TOTAL}$  é negativa, existe maior interação das moléculas da superfície entre si do que pela água – superfície hidrofóbica. Por outro lado, quando  $\Delta G_{SAS}^{TOTAL}$  é positiva, ocorre repulsão entre as moléculas do sólido e atração destas moléculas pela água, sendo essa superfície considerada hidrofílica (VAN OSS & GIESE, 1995). Do ponto de vista termodinâmico, uma bactéria (B) é considerada hidrofílica quando  $\Delta G_{BAB}^{TOTAL}$  é positiva e hidrofóbica se  $\Delta G_{BAB}^{TOTAL}$  é negativa (CHEN & ZHU, 2005).

Se a superfície e a bactéria são hidrofóbicas, ou seja,  $\Delta G_{SAS}^{TOTAL}$  é negativa e  $\Delta G_{BAB}^{TOTAL}$  também é negativa, a adesão microbiana é favorecida, visto que será mais fácil a remoção da água entre a superfície e a bactéria. Também é possível que a adesão ocorra entre uma superfície hidrofóbica e outra hidrofílica, porém em menor intensidade devido a atração da água pela superfície hidrofílica que dificulta a exposição da interface superfície de adesão/bactéria (VAN OSS & GIESE, 1995).

A fase de crescimento do biofilme é caracterizada pela multiplicação celular e pela produção de polímero extracelular. Nesta fase, ocorre uma rápida formação de biofilme culminando na cobertura completa da superfície pelo mesmo, com um ecossistema complexo de grupos bacterianos (CAPDEVILLE & NGUYEN, 1990). Pode-se separar o ciclo do biofilme em duas etapas principais: uma com o crescimento logarítmico e outra em que o ritmo de acúmulo do biofilme se torna constante, até que parte deste seja liberada, permanecendo uma fina camada original (APILÁNEZ et al., 1998).

Quando aderidos, os micro-organismos apresentam comportamento diferenciado, como exemplificado no estudo de Kubota et al. (2008) que demonstrou adesão diferenciada em lâminas de vidro utilizando-se as BAL *Lactobacillus plantarum* (*L. plantarum*), *Lactobacillus brevis* (*L. brevis*) e *Lactobacillus fructivorans* (*L. fructivorans*). As células de *L. brevis* e *L. fructivorans* tornaram-se mais alongadas que as células planctônicas (crescendo livres em caldo), porém, esse fenômeno não foi constatado em *L. plantarum*. Observou-se também, que as células planctônicas mostraram-se mais sensíveis à exposição ao ácido acético, demonstrando a proteção que a aderência infere aos micro-organismos. Os autores sugeriram três mecanismos que poderiam estar envolvidos com a resistência observada: i) aumento da resistência da

membrana celular; ii) proteção do biofilme pela camada de exopolissacarídeo, e iii) proteção das células internas pela conformação tridimensional do biofilme.

O *quorum sensing* (QS) é também considerado outro fator importante para a sobrevivência de determinados micro-organismos em biofilmes. Constitui um sistema microbiano eficiente de “comunicação”, pois as moléculas, denominadas auto-indutoras, fluem livremente através das membranas e entre as células sinalizando sua densidade e as condições ambientais. Algumas substâncias que atuam no QS já são conhecidas. Dentre elas, destacam-se compostos da classe *N*-acil-L-homoserina lactonas (AHL's) encontradas em bactérias Gram-negativas (PINTO et al., 2007). Bactérias Gram-positivas, dentre as quais as BAL, utilizam como moléculas auto-indutoras peptídeos ou peptídeos modificados após a tradução (KUIPERS et al., 1998). O sistema QS juntamente com outros fatores fisiológicos possui um controle genético que atua em condições de alta densidade populacional. Por essa razão, o QS é mais efetivo em densidade microbiana elevada, como aquela encontrada em um biofilme devidamente estabelecido. Com base nessa característica, Ruyter et al. (1997) desenvolveram uma estirpe autolítica de *L. lactis* para ser utilizada na formação de *flavor* em queijos maturados, que em condições normais é um processo lento. Dessa forma, quando essa estirpe modificada alcança determinada densidade populacional, sofre lise, liberando as enzimas, acelerando assim o processo de maturação e formação de *flavor*.

O sistema QS pode ter impacto direto nas propriedades da comunidade que liberam o sinal, e tem a finalidade de garantir a estabilidade da comunidade, e a continuação das funcionalidades relacionadas ao nicho ecológico em questão (KJELLEBERG & MOLIN, 2002).

#### **4. Biofilmes na fabricação e segurança de queijos**

As superfícies das formas e mesas de madeira que estão em contato com os queijos favorecem o desenvolvimento de uma comunidade microbiana por fornecer nutrientes em abundância. Os diversos micro-organismos ali presentes competem pelos nutrientes por meio de mecanismos diretos ou indiretos. Diretamente, isso ocorre pela liberação de metabólitos antagonistas como bacteriocinas e ácidos orgânicos – tal interação é conhecida como amensalismo. O mecanismo indireto está relacionado à competição não específica na qual determinada espécie suprime o crescimento de outra pelo melhor aproveitamento dos recursos – mecanismo conhecido como “efeito Jameson” (JAMESON, 1962). O efeito Jameson é um tipo de competição entre espécies

que utilizam recursos do ambiente maximizando a multiplicação e a densidade populacional de determinadas espécies e inibindo o crescimento de outras. Esse efeito é frequentemente observado em alimentos com dominância de BAL, como demonstrado num estudo envolvendo *Lactobacillus acidophilus* A4 (*L. acidophilus*) (KIM et al., 2009). Nesse estudo, a concentração de 1,0 mg/mL de exopolissacarídeo liberado (r-EPS) pelo *L. acidophilus* reduziu significativamente a adesão de patógenos como *E. coli* O157:H7, *Salmonella* Enteritidis, *S. Typhimurium* KCCM 11806, *Yersinia enterocolitica*, *P. aeruginosa* KCCM 11321, *Listeria monocytogenes* ScottA e *Bacillus cereus* em superfícies de poliestireno e de cloreto de polivinila (PVC). A inibição da adesão inicial e da auto-agregação foi possível devido ao r-EPS afetar parcialmente as propriedades de membrana desses micro-organismos. Esses estudos sugerem que a presença de BAL nos biofilmes das formas e mesas de madeira pode exercer um papel benéfico uma vez que ocorrendo o antagonismo a taxa de adesão de patógenos será controlada.

Estudo recente desenvolvido por equipe de pesquisadores franceses demonstrou que na produção do queijo Ragusano, o biofilme presente em tinas de madeira foi responsável pela liberação de  $5 \times 10^4$  a  $10^6$  UFC/mL de *S. thermophilus* e de  $10^4$  a  $10^6$  UFC/mL de lactobacilos termofílicos para o leite adicionado nessas tinas, após contato por 10 minutos. Essa liberação natural de micro-organismos do biofilme para o leite contribui positivamente para uma coagulação rápida e para o processo de maturação desses queijos.

Licitra et al. (2007) por meio das técnicas de *Temporal Temperature Gel Electrophoresis* (TTGE) e *Denaturing Gradient Gel Electrophoresis* (DGGE) verificaram que os biofilmes existentes em tinas de madeira, utilizadas na produção artesanal do queijo Ragusano, continham essencialmente as espécies lácticas *S. thermophilus*, *L. acidophilus* e *Leuconostoc mesenteroides*. Esses micro-organismos são liberados do biofilme para o leite acelerando o processo de acidificação e tornando mais eficiente a segurança do produto. A dinâmica populacional que ocorre na manufatura do queijo Ragusano foi acompanhada por meio de técnicas moleculares (RANDAZZO et al., 2002). A conclusão do estudo indicou que as BAL presentes no biofilme das tinas de madeira têm um papel importante na produção e segurança desse queijo pela acidificação do ambiente, que por sua vez, contribui para a inibição do crescimento de micro-organismos indesejáveis.

Nos queijos artesanais tradicionais mineiros, a microbiota benéfica do biofilme das mesas de fabricação, formas e prateleiras, podem atuar nas diferentes fases,

contribuindo para a fabricação, maturação e nas características típicas desses queijos. Esse é um tema da maior relevância, que merece estudos que consolidem a aceitação dessas hipóteses, e com isto, ressaltar a importância das técnicas repassadas pelos ancestrais para as novas gerações.

## **5. Considerações Finais**

A segurança nos queijos artesanais mineiros pode ser alcançada, inicialmente pelas BPA, e pela utilização do “pingo” – fermento endógeno contendo bactérias lácticas e outros grupos microbianos – que atuam estimulando a produção de ácido, inibindo patógenos e, portanto, garantindo a segurança dos queijos. Além disso, sabe-se que os biofilmes presentes nas mesas de madeira onde ocorrem a prensagem e a coleta da cultura endógena, contribuem para as características típicas desses queijos. A madeira é considerada pelos produtores, como o material que facilita o dessoramento do queijo, favorecendo a secagem do mesmo, resultando no produto típico, cuja tecnologia foi repassada pelas gerações anteriores.

Produtos com o status IG/DOP constituem uma das formas mais seguras para a conservação de um patrimônio ancestral em que “cada geração possui o usufruto, que deve ser transmitido intacto e se possível, melhorado, às gerações futuras” (MITTAINÉ, 1987).

É importante que novas técnicas e normas ao serem definidas para legislar produtos artesanais, sejam embasadas em estudos científicos, com dados que demonstrem que a segurança seja efetiva, sem prejuízo do “saber fazer” que constitui o bem mais valioso, característico desses produtos. A abolição de técnicas centenárias envolvidas na elaboração de produtos artesanais, como no caso, das bancas de madeira utilizadas na elaboração dos queijos artesanais tradicionais mineiros, devem ser feitas de forma comedida e com fundamentação científica, para que não haja prejuízo tanto na qualidade e tipicidade do produto quanto na credibilidade por parte do produtor, que é o artesão e principal ator dessa cadeia produtiva. A exemplo da Europa e no resto do mundo, uma grande fatia de sua economia reflete a política de estímulo aos produtos de Identificação Geográfica (IG) e de DOP. Os queijos mineiros estão no processo de solicitação de IG, primeiro passo para se chegar à DOP. Para isso, são necessários estudos relacionando a tecnologia, a ação do ambiente e as características finais do produto. Isso inclui pesquisas para verificar o real papel dos equipamentos de madeira nas características tradicionais dos queijos artesanais. A experiência positiva com os

produtos IG e DOP, principalmente nos países europeus, acenam para um futuro promissor dos queijos artesanais em Minas Gerais. No entanto, é preciso que as normas e leis não atropelam e não desestimulem os produtores, para que esses possam continuar fabricando seus produtos, com as técnicas do passado, e com a segurança exigida pelo mundo globalizado.

## 6. Referências Bibliográficas

APILÁNEZ, I.; GUTIÉRREZ, A.; DÍAZ, M. Effect of surface materials on initial biofilm development. **Bioresource Technology**, Great Britain, v.66, p.225-230, 1998.

ARAÚJO, E. A.; BERNARDES, P. C.; ANDRADE, N. J.; FERNANDES, P. E.; SÁ, J. P. N. Hidrofobicidade de ribotipos de *Bacillus cereus* isolados de indústria de laticínios. **Alimentos e Nutrição**, Araraquara, v.20, n.3, p.491-497, jul./set. 2009.

BERTOZZI, L. & PANARI, G. Cheeses with *Appellation d'Origine Contrôlée* (AOC): factors that affect quality. **International Dairy Journal**, Rennes, v.3, p.297–312, 1993.

CAPDEVILLE, I.; NGUYEN, K. M. Kinetics and modelling of aerobic and anaerobic film growth. **Water Science Technology**, Lisboa, v.22, n.11, p.149-170, 1990.

CASALTA, E.; SORBA, J-M.; AIGLE, M.; OGIER, J-C. Diversity and dynamics of the microbial community during the manufacture of Calenzana, an artisanal Corsican cheese. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v.133, p.243-251, 2009.

CHEN, G.; ZHU, H. Bacterial adhesion to silica sand as related to Gibbs energy variations. **Colloids Surfaces B: Biointerfaces**, Amsterdam, v.44, p.41-48, 2005.

CRITTENDEN, R. G.; MARTINEZ, N. R.; PLAYNE, M. J. Synthesis and utilization of folate by yoghurt starter cultures and probiotic bacteria. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v.80, p.217–222, 2003.

DIAS, B.; WEIMER, B. Conversion of methionine to thiols by Lactococci, Lactobacilli, and Brevibacteria. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington DC, v.64, p.3320–3326, 1998.

DONLAN, R. M.; COSTERTON, J. W. Biofilms: Survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. **Clinical and Microbiological Reviews**, Montana, v.15, n.2, p.167–193, 2002.

EMATER. Queijo Minas Artesanal: Tradição e Qualidade que Revelam Minas. **Revista da EMATER – MG**, Belo Horizonte, Ano XXII – n. 80. Agosto de 2004. p.8-9.

FLEMMING, H.-C.; NEU, T. R.; WOZNIAK, D. J. The EPS matrix: the “house of biofilm cells”. **Journal of Bacteriology**, Washington DC, v.189, n.22, p.7945–7947, 2007.

GALA, E.; LANDI, S.; SOLIERI, L.; NOCETTI, M.; PULVIRENTI, A. GIUDICI, P. Diversity of lactic acid bacteria population in ripened Parmigiano Reggiano cheese. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v.125, p.347–351, 2008.

GKATZIONIS, K.; LINFORTH, R. S. T.; DODD, C. E. R. Volatile profile of Stilton cheeses: Differences between zones within a cheese and dairies. **Food Chemistry**, Amsterdam, v.113, p.506–512, 2009.

JAMESON, J. E. A discussion of the dynamics of *Salmonella* enrichment. **Journal of Hygiene**, Bethesda MD, v.60, p.193–207, 1962.

KJELLEBERG, S.; MOLIN, S. Is there a role for quorum sensing signals in bacterial biofilms? **Current Opinion in Microbiology**, Amsterdam, v.5, p.254-258, 2002.

KIM, Y.; OH, S.; KIM, S. H. Released exopolysaccharide (r-EPS) produced from probiotic bacteria reduce formation of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, Amsterdam, v.379, p.324-329, 2009.

KUBOTA, H.; SENDA, S.; NOMURA, N.; TOKUDA, H.; UCHIYAMA, H. Biofilm Formation by Lactic Acid Bacteria and Resistance to Environmental Stress. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, Amsterdam, v.106, n.4, p.381–386, 2008.

KUIPERS, O. P.; RUYTER, P. G. G. A.; KLEEREBEZEM, M.; VOS, W. M. Quorum sensing-controlled gene expression in lactic acid bacteria. **Journal of Biotechnology**, Amsterdam, v.64, p.15-21, 1998.

LICITRA, G.; OGIER, J. C.; PARAYRE, S.; PEDILIGGIERI, C.; CARNEMOLLA, T. M.; FALENTIN, H.; MADEC, M. N.; CARPINO, S.; LORTAL, S. Variability of Bacterial biofilms of the “Tina” wood vats used in the Ragusano cheese-making process. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington DC, v.73, n.21, p.6980-6987, 2007.

LORTAL, S.; DI BLASI, A.; MADEC, M-N.; PEDILIGGIERI, C.; TUMINELLO, L.; TANGUY, G.; FAUQUANT, J.; LECUONA, Y.; CAMPO, P.; CARPINO, S.; LICITRA, G. Tina wooden vat biofilm: A safe and highly efficient lactic acid bacteria delivering system in PDO Ragusano cheese making. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v.132, p.1-8, 2009.

MAAS, S.; GIMBERT, F.; LUCOT, E.; CRINI, N.; BADOT, P-M. Trace metals in raw cows' milk and assessment of transfer to Comté cheese, **Food Chemistry**, Amsterdam, 2010.

MADRAU, M. A.; MANGIA, N. P.; MURGIA, M. A.; SANNA, M. G.; GARAU, G.; LECCIS, L.; CAREDDA, M.; DEIANA, P. Employment of autochthonous microflora in Pecorino Sardo cheese manufacturing and evolution of physicochemical parameters during ripening. **International Dairy Journal**, Rennes, v.16, p.876–885, 2006.

MARIANI, C.; BRIANDET, R.; CHAMBA, J.-F.; NOTZ, E.; CARNET-PANTIEZ, A.; EYOUNG, R. N.; OULAHAL, N. Biofilm Ecology of Wooden Shelves Used in Ripening the French Raw Milk Smear Cheese Reblochon de Savoie. **Journal of Dairy Science**, Amsterdam, v.90, p.1653–1661, 2007.

MARTINS, J. M. Características físico-químicas e microbiológicas durante a maturação do queijo Minas artesanal da região do Serro. 2006. 146 p. Tese (Doutorado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 2006.

MINAS GERAIS (a). Lei 14.185, de 31 de janeiro de 2002. Dispõe sobre o processo de produção de queijo Minas artesanal. 2002. Disponível em: <[http://hera.almg.gov.br/cgi-bin/nph-brs?col=e&d=NJMG&p=1&u=http://www.almg.gov.br/njmg/chama\\_pesquisa.asp&SECT1=IMAGE&SECT2=THESOFF&SECT3=PLUROFF&SECT6=HITIMG&SECT7=LINKON&l=20&r=1&f=G&s1=DECRETO 42645 2002.NORM.&SECT8=SOTEXTO](http://hera.almg.gov.br/cgi-bin/nph-brs?col=e&d=NJMG&p=1&u=http://www.almg.gov.br/njmg/chama_pesquisa.asp&SECT1=IMAGE&SECT2=THESOFF&SECT3=PLUROFF&SECT6=HITIMG&SECT7=LINKON&l=20&r=1&f=G&s1=DECRETO 42645 2002.NORM.&SECT8=SOTEXTO)>. Acesso em: 20 set. 2010.

MINAS GERAIS (b). 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. Disponível em: <<http://www.ima.mg.gov.br/component/search/?searchword=portaria+518&ordering=&searchphrase=all>>. Acesso em: 26 jan. 2011.

MITTAINÉ J. As denominações de origem nos queijos. Cap V. In: André Eck (coordenador) O queijo. Volume 2. **Le Fromage** (original). Publicações Europa-America Ltda. Mem Martins, Portugal. 329 p. 1987.

PINTO, M. S.; FERREIRA, C. L. L. F.; MARTINS, J. M.; TEODORO, V. A. M.; PIRES, A. C. S.; FONTES, L. B. A.; VARGAS, P. I. R. Segurança alimentar do queijo Minas artesanal do Serro, Minas Gerais, em função da adoção de boas práticas de fabricação. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, Goiânia, v.39, n.4, p.342-347, 2009.

PINTO, U. M.; VIANA, E. S.; MARTINS, M. L.; VANETTI, M. C. D. Detection of acylated homoserine lactones in gram-negative proteolytic psychrotrophic bacteria isolated from cooled raw milk. **Food Control**, Amsterdam, v.18, p.1322-1327, 2007.

POVEDA, J. M.; CABEZAS, L.; MCSWEENEY, P. L. H. Free amino acid content of Manchego cheese manufactured with different starter cultures and changes throughout ripening. **Food Chemistry**, Amsterdam, v.84, p.213–218, 2004.

RANDAZZO, C. L.; TORRIANI, L.; AKKERMANS, A. D. L.; DE VOS, W. M.; VAUGHAN, E. E. Diversity, Dynamics, and Activity of Bacterial Communities during Production of an Artisanal Sicilian Cheese as Evaluated by 16S rRNA Analysis. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington DC, v.68, n.4, p.1882–1892, 2002.

RAO, D. R. & SHAHANI, K. M. Vitamin content of cultured milk products. **Cultured Dairy Products Journal**, Amsterdam, v.22, p.6–10, 1987.

RUYTER, P. G. G. A.; KUIPERS, O. P.; DE VOS, W. M. Food-grade controlled lysis of *Lactococcus lactis* for accelerated cheese ripening. **Nature Biotechnology**, Boston, v.15, p.976–979, 1997.

SAILER, M. F.; VAN NIEUWENHUIJZEN, E. J.; KNOL, W. Forming of a functional biofilm on wood surfaces. **Ecological Engineering**, Amsterdam, v.36, p.163-167, 2010.

SOLIERI, L. & GIUDICI, P. Yeasts associated to Traditional Balsamic Vinegar: Ecological and technological features. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v.125, p.36–45, 2008.

STREVETT, K. A. & CHEN, G. Microbial surface thermodynamics and applications. **Research in Microbiology**, Amsterdam, v.154, n.5, p.329-335, 2003.

SWAFFIELD, C. H.; J. A. SCOTT; B. JARVIS. Observations on the microbial ecology of traditional alcoholic cider storage vats. **Food Microbiology**, Amsterdam, v.14, p.353–361, 1997.

TREGEAR, A.; ARFINI, F.; BELLETTI, G.; MARESCOTTI, A. Regional foods and rural development: The role of product qualification. **Journal of Rural Studies**, Amsterdam, v.23, p.12–22, 2007.

TRULEAR, M. G. & CHARACKLIS, W. G. Dynamics of biofilm processes. **Journal of Water Pollution Control Federation**, Londres, v.54, n.9, p.1288-1301, 1982.

VAN HYLCKAMA Vlieg, J. E. T.; HUGENHOLTZ, J. Mining natural diversity of lactic acid bacteria for *flavour* and health benefits. **International Dairy Journal**, Amsterdam, v.17, p.1290-1297, 2007.

VAN OSS, C. J.; GIESE, R. F. The hydrophilicity and hydrophobicity of clay minerals. **Clays and Clay Minerals**, New York, v.43, p.474-477, 1995.

WU, Q. T.; GAO, T.; ZENG, S.; CHUA, H. Plant–biofilm oxidation ditch for in situ treatment of polluted water. **Ecological Engineering**, Amsterdam, v.28, p.124–130, 2006.

## **CAPÍTULO II**

### **ASPECTOS MICROBIOLÓGICOS E ULTRA ESTRUTURA DO BIOFILME DE UTENSÍLIOS DE MADEIRA UTILIZADOS NA FABRICAÇÃO DO QUEIJO MINAS ARTESANAL DO SERRO E CANASTRA.**

## **Aspectos microbiológicos e ultra estrutura do biofilme de utensílios de madeira utilizados na fabricação do queijo Minas artesanal do Serro e Canastra.**

### **Resumo**

O queijo Minas artesanal é produzido a partir de leite cru de vaca adicionado de coalho e fermento endógeno e durante seu processamento entra em contato com formas, mesas e prateleiras de madeira, nos quais desenvolvem biofilmes. Devido à dificuldade de higienização, as formas e mesas de madeira utilizadas no processamento do queijo Minas artesanal foram eliminadas pela legislação do Estado de Minas Gerais, e substituídas por formas de polipropileno e polietileno de alta densidade e as mesas por ardósia ou aço inoxidável. No entanto, a modificação dos utensílios pelos novos materiais causou alterações nas características dos queijos. Devido a inexistência de estudos científicos que indiquem a composição microbiana dos biofilmes formados nesses utensílios o presente estudo objetivou avaliar as contagens de *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, coliformes a 32 °C, leveduras, *Lactobacillus* spp. mesofílicos e *Lactococcus* spp. nesses biofilmes, no leite, no fermento endógeno e nos queijos maturados de duas regiões tradicionais: Serro e Canastra. Fragmentos dos utensílios de madeira foram obtidos para a avaliação em microscopia eletrônica de varredura. Contagens elevadas de *S. aureus* ( $> 2,9 \log_{10}$ UFC/mL), *E. coli* ( $> 3,5 \log_{10}$ UFC/mL) e coliformes a 32 °C ( $> 3,8 \log_{10}$ UFC/mL) foram encontrados nas amostras de leite da região do Serro. O mesmo ocorreu nas amostras de leite da Canastra para *S. aureus* e coliformes a 32 °C ( $2,5 \log_{10}$ UFC/mL). Observou-se ausência de *Salmonella* sp. e *Listeria* sp. nos queijos maturados à temperatura ambiente na região do Serro (17 dias) e Canastra (22 dias). Dois terços dos queijos do Serro, ao final da maturação estavam dentro dos padrões vigentes para *S. aureus* e 100 % para *E. coli* e coliformes a 32 °C, enquanto os queijos da Canastra apresentaram contagens acima do permitido para coliformes a 32 °C e *E. coli*, devido a medidas sanitárias insatisfatórias. Os biofilmes dos utensílios do Serro permaneceram dentro dos limites de segurança propostos nessa pesquisa para *S. aureus* e *E. coli* ( $\leq 5$  UFC/cm<sup>2</sup>) e coliformes a 32 °C ( $\leq 25$  UFC/cm<sup>2</sup>). Na Canastra, somente os níveis médios de *E. coli* nas prateleiras de maturação dos queijos estavam baixos. Dessa forma, a qualidade dos queijos está relacionada à melhoria da qualidade microbiológica do leite de ambas as regiões, na aplicação e manutenção das boas práticas de fabricação e higienização eficiente dos utensílios.

**Palavras-chave:** biofilme, microscopia eletrônica de varredura, bactérias do ácido láctico, patógenos, qualidade microbiológica.

### **Abstract**

Artisanal Minas cheese is produced from raw cows' milk added rennet and endogenous culture and during processing comes into contact with wooden utensils such as form, table and shelf, in which biofilms develop. Due to the difficulty of cleaning the wooden tables and forms were eliminated by the laws of the State of Minas Gerais, and replaced by forms of polypropylene and high density polyethylene and the tables for slate or stainless steel. However, the change of the utensils by the new materials caused modifications in the characteristics of the cheeses and has been noted by producers. Due to the absence of scientific studies that indicate the microbial composition of biofilms formed in these utensils the present study evaluated the counts of *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, coliforms at 32°C, yeasts, mesophilic *Lactobacillus* spp. and *Lactococcus* spp. in these biofilms, milk, endogenous culture and ripened cheeses in two traditional regions: Serro and Canastra. High counts of *S. aureus* ( $>2.9 \log_{10}\text{CFU/ml}$ ), *E. coli* ( $>3.5 \log_{10}\text{CFU/ml}$ ) and coliforms at 32°C ( $>3.8 \log_{10}\text{CFU/ml}$ ) were found in the milk of the region of Serro. The same occurred in the milk of Canastra for *S. aureus* and coliforms at 32°C ( $2.5 \log_{10}\text{CFU/ml}$ ). There was no *Salmonella* sp. and *Listeria* sp. in ripened cheeses. Two-thirds of the Serro cheese, at the end of ripening were within current standards for *S. aureus* and 100% for *E. coli* and coliforms at 32°C, while the Canastra cheese had counts above the allowed limit for coliforms at 32°C and *E. coli*, due to poor sanitary measures. Biofilms of the utensils from Serro remained within safe limits proposed in this study for *S. aureus* and *E. coli* ( $\leq 5 \text{ CFU/cm}^2$ ) and coliforms at 32°C ( $\leq 25 \text{ CFU/cm}^2$ ). In Canastra, only average levels of *E. coli* on the cheese ripening shelves were low. Thus, the microbial quality of the cheeses is related to improving the microbiological quality of milk from both regions, implementation and maintenance of good manufacturing practices and efficient cleaning of utensils.

**Key words:** biofilm, scanning electron microscopy, lactic acid bacteria, pathogens, microbiologic quality.

## 1. Introdução

No processo de fabricação, o queijo Minas artesanal produzido a partir do leite cru de vaca entra em contato com as formas e mesas de madeira durante a enformagem e prensagem manual e permanece em prateleiras de madeira para a maturação (EMATER, 2004). O acúmulo de resíduos nesses utensílios, dentre os quais, proteínas, carboidratos e outros componentes presentes no leite, contribui para a formação de biofilme (Capdeville & Nguyen, 1990; Trulear & Characklis, 1982). O biofilme de utensílios presentes no ambiente de queijarias é comumente formado por micro-organismos componentes da microbiota do leite, como leveduras e bactérias do ácido láctico (BAL) e também por micro-organismos presentes no ar e nas mãos dos manipuladores como fungos filamentosos e patógenos. Esse biofilme, ao se desprender da superfície dos utensílios de madeira irá se somar à microbiota do fermento endógeno (“pingo”) e, conseqüentemente, estará presente nos queijos onde contribuirá para sua maturação (Lortal *et al.*, 2009).

A Portaria nº 518 de 14 de junho de 2002 do Estado de Minas Gerais, dispôs sobre os requisitos básicos das instalações, materiais e equipamentos para a fabricação do queijo Minas artesanal (Minas Gerais, 2002a), direcionando a adequação dos produtores às normas de boas práticas de fabricação (BPF). Como medida emergencial, formas de madeira foram substituídas por formas de polipropileno no Serro e polietileno de alta densidade na Canastra e as mesas de madeira por ardósia ou aço inoxidável. A substituição da madeira nesses utensílios gerou alterações nas características dos queijos. De acordo com os produtores, esses novos materiais não contribuem para a sinérese do queijo, afetando o sabor e a textura tradicionais. Além disso, estudos europeus indicam que o biofilme formado em utensílios de madeira tem um papel nas características de queijos maturados e que possuem Denominação de Origem Protegida (DOP), como o Ragusano (Lortal *et al.*, 2009) e Reblochon de Savoie (Mariani *et al.*, 2007). No Brasil, as madeiras comumente utilizadas para a produção das mesas e formas são o Ipê roxo (*Tabebuia avellanadae*) e Peroba rosa (*Aspidosperma* sp.). Essas mesas (bancadas) possuem aproximadamente 300 cm x 50 cm, com leve inclinação em sentido longitudinal para facilitar a sinérese.

No método tradicional, após a enformagem, os queijos artesanais do Serro e da Canastra são colocados em prateleiras de madeira para maturação (Minas Gerais, 2002a). Durante esse processo, diferentes modificações físico-químicas como redução do pH (Beuchat & Golden, 1989), diminuição do potencial de oxi-redução (Crow *et al.*,

1995) e diminuição da atividade de água (Brown, 1976) restringem o crescimento de patógenos e permitem a multiplicação de micro-organismos melhores adaptados nessas condições, como as BAL. Em diferentes momentos, micro-organismos como BAL e leveduras originados do fermento endógeno e/ou biofilme dos utensílios de madeira produzem enzimas, ácidos orgânicos e outros compostos antimicrobianos como peptídeos e bacteriocinas que auxiliam na segurança do produto (González *et al.*, 2007). Além disso, essas modificações são essenciais para a definição do aroma, sabor e textura dos queijos.

Considerando que as mesas e formas de madeira foram eliminadas da produção desses queijos e que tal decisão causou modificações nas características dos mesmos, e ainda, a inexistência de estudos científicos que indiquem a composição microbiana dos biofilmes formados nesses utensílios, o presente estudo objetivou avaliar as características microbiológicas e a ultra estrutura dos biofilmes formados nas mesas, formas e prateleiras utilizadas na fabricação do queijo Minas artesanal das regiões do Serro e da Canastra.

## **2. Material e Métodos**

### *2.1. Amostragem do Biofilme*

Devido à dificuldade de se localizar produtores que ainda mantenham as mesas e formas de madeira, nas duas regiões o número de amostras embora pequeno, correspondem a quase a totalidade dos utensílios de madeira ainda em utilização. Não foi intenção desse trabalho realizar o rastreamento dos micro-organismos entre as amostras de cada produtor, mas sim de verificar as contagens dos micro-organismos, particularmente nos utensílios de madeira.

Amostras para avaliação de biofilme dos utensílios de madeira foram obtidas por remoção pelo método do *swab* (APHA, 2001), delimitando-se a área de amostragem com um molde esterilizado de 10 cm x 10 cm para coleta nas prateleiras e mesas e 2 cm x 2 cm para as formas de madeira. Amostras para avaliação dos biofilmes foram coletadas em superfícies de seis mesas, três formas e quatro prateleiras – Serro; e superfícies de três mesas e três prateleiras – Canastra (Figuras 1A e B). Os mesmos grupos microbianos foram avaliados em cinco amostras de leite, quatro de fermento endógeno e três queijos maturados da região do Serro. Na Canastra, foram coletadas três amostras de leite, três de fermento endógeno e três queijos maturados. Três amostras de 100 cm<sup>2</sup> para avaliação do biofilme de cada mesa foram coletadas e plaqueadas,

separadamente, sendo uma amostra retirada na porção central e outras duas em suas extremidades. Obteve-se a média das contagens encontradas nos três pontos avaliados. Na prateleira coletou-se uma amostra de 100 cm<sup>2</sup> e na forma utilizou-se um *swab* para coletar quatro amostras de 4 cm<sup>2</sup>. Após as coletas, cada *swab* foi colocado em frasco com 10 mL de solução tampão fosfato, esterilizado por autoclavagem (121 °C / 15 min), devidamente identificado e armazenado em gelo até o momento das avaliações microbiológicas. Alíquota de 1 mL proveniente de cada amostra de superfície foi diluída em 9 mL de solução tampão fosfato 0,1 %, seguido de diluições decimais seriadas antes dos plaqueamentos em profundidade nos meios preparados em laboratório.

## 2.2. Análises microbiológicas

Alíquotas de 1 mL de leite e fermento endógeno foram diluídas em 9 mL de solução tampão fosfato 0,1 %, seguido de diluições decimais seriadas antes do plaqueamento. Foram retiradas porções de 25 g de cada queijo maturado para homogeneização em 225 mL de solução tampão fosfato 0,1 % utilizando-se *Stomacher* (Bagmixer® 400, Modelo VW, França) durante 2 min em baixa velocidade. Diluições decimais seriadas foram feitas nas amostras previamente homogeneizadas antes dos plaqueamentos em profundidade nos meios preparados em laboratório.

Os micro-organismos quantificados foram: mesófilos aeróbios totais, leveduras, *Lactobacillus* spp. mesofílicos, *Lactococcus* spp., *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e coliformes a 32 °C (designados aqui simplesmente por coliformes). A contagem de mesófilos aeróbios no biofilme dos utensílios de madeira, no leite, no fermento endógeno e nos queijos maturados foi realizada em *Plate Count Agar* (Difco, USA) incubando-se a 30 °C / 48 h. Leveduras foram contadas após incubação aeróbia a 28 °C / 5 d em *Potato Dextrose Agar* (Difco, USA). *Lactobacillus* spp. mesofílicos foram cultivados em anaerobiose em ágar MRS (Difco, USA – De Man, Rogosa & Sharpe, 1960) e *Lactococcus* spp. em aerobiose em ágar M17 (Difco, USA – Terzaghi & Sandine, 1975), e incubados a 30 °C / 48 h. *S. aureus*, *E. coli* e coliformes foram avaliados em placas Petrifilm® (3M, USA) específicas e incubadas conforme protocolo do fabricante. A avaliação microbiológica foi feita nos queijos maturados, sendo 17 dias para o Serro (Martins, 2006) e 22 dias para o queijo Canastra (Dores, 2007). Exceto Petrifilm®, todos os plaqueamentos foram realizados em duplicata. A verificação da presença de *Salmonella* sp. e *Listeria* sp. nos queijos foi realizada nos tempos de

maturação mencionados acima, empregando-se kits Reveal<sup>®</sup> Neogen, seguindo-se o protocolo do fabricante, que envolve uma etapa de enriquecimento antes do teste.

### 2.3. *Microscopia eletrônica de varredura*

Fragmentos da madeira dos utensílios foram obtidos para a microscopia eletrônica de varredura (MEV). As amostras foram fixadas em solução 1:1 (v/v) de glutaraldeído 4% e paraformaldeído 4% (Karnovsky, 1965), durante 12 h. Em seguida, procedeu-se a lavagem das amostras com tampão de cacodilato de sódio por 12 h. Na etapa seguinte os fragmentos foram desidratados em banhos seriados de etanol (30, 50, 70, 80, 95, 100, 100, 100%) durante 15 min cada banho, a 20–25 °C. Após desidratadas, as amostras foram secas em um secador de ponto crítico com CO<sup>2</sup> (Bal-Tec, CPD030, Inglaterra). Finalmente, as amostras foram metalizadas com ouro por 2 min (Balzers, FDU010, Alemanha) e visualizadas em MEV usando uma voltagem de 20 kV (LEO 1430, Modelo VP, Inglaterra).

### 2.4. *Análise dos Resultados*

As contagens microbianas foram avaliadas pelo método de estatística descritiva. Os gráficos foram plotados no software SigmaPlot 10.0 (Systat Software Inc., San Jose, California, USA).

## 3. Resultados

### 3.1. *Contagem de grupos relacionados à microbiota do queijo Minas artesanal*

As contagens médias de mesófilos aeróbios totais, leveduras, *Lactobacillus* spp. mesofílicos e *Lactococcus* spp. das amostras de leite, fermento endógeno, queijo e superfície de madeira das regiões do Serro e Canastra estão representadas na Figura 2. As contagens de mesófilos aeróbios em amostras de leite do Serro e em uma amostra de leite da Canastra estavam acima do estipulado pela legislação ( $> 5 \log_{10}$ UFC/mL). Na região do Serro os valores obtidos para mesófilos aeróbios nos utensílios de madeira situaram-se entre  $0,96 \log_{10}$ UFC/cm<sup>2</sup> na forma e  $6,24 \log_{10}$ UFC/cm<sup>2</sup> na prateleira. Na Canastra, o menor e o maior valor de mesófilos aeróbios observado foram 3,5 e  $6,24 \log_{10}$ UFC/cm<sup>2</sup> nas mesas. A variação da contagem de leveduras observada na Canastra foi de  $2,46 \log_{10}$ UFC/mL no leite a  $5,93 \log_{10}$ UFC/g no queijo. No Serro, a maior contagem de leveduras foi verificada no fermento ( $5,92 \log_{10}$ UFC/mL) e a menor na

superfície da forma ( $< 1$  UFC/cm<sup>2</sup>). Amostras de fermento do Serro e da Canastra apresentaram, em média, 4,85 e 3,85 log<sub>10</sub>UFC/mL de leveduras, respectivamente.

As BAL *Lactobacillus* spp. mesofílicos e *Lactococcus* spp. também foram enumerados e as contagens mínimas e máximas das amostras analisadas estão dispostas na tabela 1.

### 3.2. Enumeração de micro-organismos indicadores de segurança do queijo Minas artesanal

As contagens médias dos micro-organismos indicadores nas amostras de leite, fermento endógeno, queijo e superfície de madeira das regiões do Serro e da Canastra estão representadas na Figura 3. As contagens de *S. aureus*, principal indicador de segurança alimentar, em todas as amostras de queijo maturado da Canastra e em dois queijos do Serro estavam abaixo do limite máximo ( $\leq 2$  log<sub>10</sub>UFC/g) permitido pela legislação (Minas Gerais, 2002b). Entretanto, as contagens desse patógeno em quatro amostras de leite do Serro e em duas da Canastra estavam acima do padrão vigente ( $> 2$  log<sub>10</sub>UFC/mL). Os queijos do Serro estavam com baixas contagens de *E. coli* e coliformes. Na Canastra, somente um queijo estava com baixas contagens desses contaminantes. Sessenta por cento das amostras de leite do Serro apresentaram elevadas contagens de *E. coli* ( $> 3,5$  log<sub>10</sub>UFC/mL). As amostras de leite da Canastra estavam com contagens seguras para esse patógeno. A legislação vigente para o leite não define limite para coliformes, portanto, estabeleceu-se o valor de 500 UFC/mL (2,7 log<sub>10</sub>UFC/mL), representando a metade do que se propõe para os coliformes nos queijos, iniciando o processamento com menor contaminação. Diante disso, uma amostra de leite da Canastra e quatro do Serro estavam com contaminação por coliformes superior a 3,6 log<sub>10</sub>UFC/mL. Como também não existe legislação que estabeleça limite de micro-organismos indicadores de segurança para o fermento endógeno utilizado na fabricação do queijo Minas artesanal, os mesmos padrões do leite foram empregados, considerando como baixa contaminação valores iguais/menores a 2 log<sub>10</sub>UFC/mL para *S. aureus* e *E. coli* e 2,7 log<sub>10</sub>UFC/mL para coliformes. Sendo assim, somente uma amostra de fermento da Canastra estava em desacordo para coliformes, estando as demais dentro dos padrões adotados. Por outro lado, 50 % das amostras de fermento do Serro estavam com contagens de *S. aureus* superiores a 2,7 log<sub>10</sub>UFC/mL, 75 % superiores a 2,6 log<sub>10</sub>UFC/mL para *E. coli* e 50 % superiores a 2,8 log<sub>10</sub>UFC/mL para coliformes.

Para as superfícies de madeira, estabeleceu-se o limite para *S. aureus* e *E. coli* em 20 vezes menos ( $5 \text{ UFC/cm}^2$  ou  $0,7 \log_{10}\text{UFC/cm}^2$ ) do que o limite estabelecido pela legislação para o queijo Minas artesanal. Além disso, o valor proposto corresponde a 10 vezes menos do que a Organização Mundial da Saúde recomenda para mesófilos aeróbios em superfícies segundo Silva Jr. (2001). Limitou-se a contagem de coliformes nas superfícies de madeira em cinco vezes a contagem de *E. coli* ( $25 \text{ UCF/cm}^2$  ou  $1,4 \log_{10}\text{UFC/cm}^2$ ), por serem menos relacionados a patógenos. As formas do Serro estavam com baixas contagens de *E. coli* e coliformes, estando apenas uma delas superior a  $1,1 \log_{10}\text{UFC/cm}^2$  para *S. aureus*. Todas as mesas do Serro apresentaram baixa contaminação por *S. aureus* e *E. coli* e somente duas delas (33,3 %) estavam em desacordo para coliformes. Na Canastra, uma mesa apresentou contagem inferior ao estabelecido para *S. aureus* e coliformes e 66,6 % para *E. coli*. Somente uma prateleira do Serro estava em desacordo para os indicadores avaliados. Na Canastra, as prateleiras apresentaram contaminação, sendo duas com *S. aureus* e uma com *E. coli*. Não foram detectadas *Salmonella* sp. e *Listeria* sp. nas amostras de queijos maturados de ambas as regiões.

### 3.3. pH e umidade dos queijos

O pH dos queijos maturados do Serro variou de 4,58 a 4,77 e da Canastra 4,57 a 4,88. O pH das amostras de fermento variou entre 4,41–5,13 no Serro e 5,53–5,67 na Canastra. O teor de umidade dos queijos de ambas as regiões após o período de maturação de 17 e 22 dias para Serro e Canastras, respectivamente, encontravam-se abaixo dos 45,9 % indicados pela legislação (Minas Gerais, 2008), com médias 37,3 % na Canastra e 37,4 % no Serro.

### 3.4. Ultra estrutura do biofilme dos utensílios

As micrografias eletrônicas mostraram que as superfícies dos utensílios estavam quase totalmente cobertas por um diversificado ecossistema composto por cocos, bacilos, leveduras e fungos filamentosos (Figura 4). As amostras das mesas de ambas as regiões exibiram uma diversidade de micro-organismos, embora fungos filamentosos tenham sido verificados com maior frequência nas mesas do Serro e raramente nas mesas da Canastra. Verificou-se nas mesas e prateleiras da Canastra uma maior predominância de cocos (Figuras 4D e E). Observou-se nos utensílios do Serro maior

predominância de cocos, embora bacilos tenham sido visualizados mais frequentemente nos utensílios dessa região do que nos utensílios da Canastra.

#### 4. Discussão

A madeira é historicamente utilizada na manufatura de utensílios empregados na fabricação de alimentos artesanais como vinagre (Solieri & Giudici, 2008), cidras (Del Campo *et al.*, 2003) e queijos, sobretudo, aqueles com *status* DOP comercializados em países da Europa (Casalta, Sorba, Aigle, & Ogier, 2009; Lortal *et al.*, 2009; Mariani *et al.*, 2007). O contato da madeira com componentes do leite e do queijo permite o desenvolvimento de um biofilme. Como poucas pesquisas descreveram a diversidade do biofilme de superfícies de madeira e/ou mostraram o papel que o mesmo exerce nas características típicas e de segurança de queijos artesanais (Lortal *et al.*, 2009; Licitra *et al.*, 2007; Mariani *et al.*, 2007), no presente estudo, a composição microbiana, a segurança e a ultra estrutura do biofilme dos utensílios de madeira foram exploradas em duas distintas regiões produtoras do queijo Minas artesanal.

As maneiras de fabricação do queijo Minas artesanal nas regiões do Serro e Canastra são similares na ordenha, adição de fermento e coalho no leite. A partir da etapa de enformagem, os produtores do Serro prensam a coalhada no interior das formas manualmente. Por outro lado, na Canastra, a coalhada é colocada no interior de tecidos que auxiliam na prensagem. Por esse motivo, os queijos produzidos na Canastra, inicialmente, possuem um menor teor de umidade que os queijos do Serro, desse modo, é necessário um maior tempo de maturação para os queijos da Canastra, conforme verificado por Dores (2007).

As altas contagens obtidas de mesófilos aeróbios nas amostras de leite e fermento de ambas as regiões refletem os correspondentes níveis de BAL enumeradas nessas matérias-primas. A elevada contagem de mesófilos aeróbios nas superfícies das mesas e prateleiras das duas regiões confirma a existência de um biofilme com microbiota diversificada, assim como observado por Lortal *et al.* (2009) em biofilme formado em tinas de madeira utilizadas na fabricação do queijo Ragusano. A elevada contagem de mesófilos aeróbios nas amostras de leite podem estar relacionadas às altas contagens de lactobacilos mesofílicos e lactococos nas mesmas.

As leveduras presentes nos biofilmes podem agir de duas maneiras nos queijos artesanais. Primeiramente, podem causar deterioração do produto pela produção de *flavor* indesejável, descoloração, produção de gás e alteração na textura do queijo

(Fleet, 1990). No entanto, podem exercer ações benéficas pelas atividades de proteólise e lipólise com formação de aroma durante a maturação (De Freitas, Pinon, Maubois, Lortal, & Thierry, 2009; Fadda, Mossa, Pisano, Delphano, & Cosentino, 2004). Borelli *et al.* (2006) obteve contagens de leveduras acima de  $7 \log_{10}$ UFC/g no queijo Canastra com cinco dias de maturação e dentre as diversas espécies presentes, as principais foram *Candida catenulata*, *Debaryomyces hansenii*, *Torulaspota delbrueckii* e *Kluyveromyces lactis*. Esse último é capaz de fermentar e assimilar lactose (Fleet, 1990) e, assim, deve participar sinergicamente às BAL na acidificação inicial do queijo. Essa elevada contagem pode estar relacionada ao tempo insuficiente de maturação do queijo Canastra, que aos 22 dias, possivelmente, alcançaria valores próximos aos obtidos nessa pesquisa ( $5,2 \log_{10}$ UFC/g).

As baixas contagens no Serro para *S. aureus* em todas as mesas e de *E. coli* em cinco mesas e em uma mesa da Canastra para *S. aureus* e duas para *E. coli*, podem ser atribuídas à condição ácida das superfícies, cujo pH deve situar-se próximo ao pH médio do fermento do Serro (4,68) e da Canastra (5,58). Sabendo-se que o pH tem influência na capacidade de adesão de um micro-organismo (Mafu, Plumety, Deschênes, & Goulet, 2011) e que baixos valores de pH diminuem a taxa de adesão de *S. aureus* (Zmantar, Kouidhi, Miladi, Mahdouani, & Bakhrouf, 2010) e *E. coli* (Mafu *et al.*, 2011), pode-se pressupor que as menores contagens de *S. aureus* e *E. coli* observadas nas mesas do Serro em relação às mesas da Canastra podem estar relacionadas ao pH mais baixo do respectivo fermento. E ainda, fatores como a produção de exopolissacarídeos (Kim, Oh, & Kim, 2009) e bacteriocinas pelas BAL (González *et al.*, 2007), competição por nutrientes e sítios de adesão devem ser considerados. Segundo Carmo *et al.* (2002) as intoxicações alimentares provocadas pelas enterotoxinas de *S. aureus* ocorrem quando as contagens destes ultrapassa  $6 \log_{10}$ UFC/g no alimento. Por isso é fundamental que se controle as contagens desse patógeno nos utensílios e, principalmente, nas matérias-primas. A qualidade microbiológica do leite deve receber uma atenção especial, visto que este é a principal fonte de micro-organismos que irão formar o biofilme dos utensílios e direcionar a segurança na utilização dos mesmos. Sendo assim, verificou-se que o leite da região do Serro deve receber melhores cuidados, pois 80 % das amostras estavam com contagens elevadas de *S. aureus* ( $3-4,75 \log_{10}$ UFC/mL) e coliformes ( $3-5,9 \log_{10}$ UFC/mL) e 60 % de *E. coli* ( $3,5-5,88 \log_{10}$ UFC/mL), indicando BPF insatisfatórias. Dois terços das amostras de leite da Canastra também se encontram em níveis de alerta para *S. aureus* ( $2,2-4,2 \log_{10}$ UFC/mL) e coliformes ( $2,2-3,6 \log_{10}$ UFC/mL). Embora seja conhecido o

papel da maturação na eliminação de patógenos, verifica-se que o início do processamento com uma matéria-prima com qualidade microbiológica, favorece o papel da maturação para se manter as contagens abaixo dos valores estabelecidos pela legislação. Quando se correlaciona as contagens de *E. coli* no leite com as contagens destes nos queijos maturados, verificou-se que mesmo quando as amostras de leite da Canastra apresentaram baixas contagens de *E. coli*, os queijos de dois produtores estavam com números acima dos padrões de segurança ( $> 3,3 \log_{10}\text{UFC/g}$ ). Exceto para *S. aureus* de um queijo, o oposto foi verificado nos queijos do Serro, os quais estavam dentro dos padrões da legislação vigente, enquanto as amostras de leite apresentaram contagens médias acima do permitido para os patógenos avaliados. Isso indica que a contaminação existente nos utensílios de madeira tem aporte principal pelo leite. Os números elevados de *S. aureus* e coliformes observados em algumas amostras de leite da Canastra devem influenciar diretamente as altas contagens obtidas nos utensílios. Entretanto, *S. aureus* estavam em baixos níveis ( $< 1 \log_{10}\text{UFC/g}$ ) nos queijos da Canastra, ao passo que *E. coli* estavam presentes e coliformes continuaram elevados, sugerindo higienização incorreta das prateleiras. E ainda, observou-se que as mesas da Canastra continham ranhuras em toda a superfície, o que dificulta sua higienização, propiciando acúmulo de matéria-orgânica e multiplicação microbiana. Portanto, os produtores de ambas as regiões devem aplicar um maior rigor nas BPF e na Canastra uma melhor higienização dos utensílios, para dessa forma, reduzir a entrada de patógenos e contaminantes no início da manufatura do queijo.

As altas contagens de *Lactobacillus* spp. mesofílicos e *Lactococcus* spp. constatadas nos biofilmes das formas, mesas e prateleiras de ambas as regiões são desejáveis, visto que esses micro-organismos podem ser liberados do biofilme e somar aos já existentes no leite (Lortal *et al.*, 2009), e ainda, serem acrescidos ao fermento que será utilizado na próxima batelada. As BAL são responsáveis pela produção de *flavor* em queijo maturado (Randazzo, Pitino, Ribbera & Caggia, 2010; Awad, Ahmed & El Soda, 2007), e também pela acidificação e produção de compostos antimicrobianos (Settanni, Franciosi, Cavazza, Cocconcelli, & Poznanski, 2011; Kim *et al.*, 2009) que inibem o crescimento de patógenos e controlam a multiplicação de deterioradores e contaminantes.

A variabilidade de formas observadas nas MEV pode estar relacionada aos diversos modos de higienização empregados pelos produtores de cada região. Embora neste trabalho não tenha sido feita a quantificação de fungos filamentosos nos biofilmes, os mesmos foram constatados nas micrografias de algumas mesas e prateleiras das duas

regiões e em formas do Serro (Figura 4B), mostrando a diversidade de microorganismos que podem constituir um biofilme. As baixas contagens microbianas obtidas em alguns utensílios, por si só, não indicam a formação de um biofilme. Entretanto, as fotomicrografias comprovam a presença de tal estrutura.

Concluindo, os utensílios de madeira da região do Serro não contribuem para a contaminação dos queijos, uma vez que as contagens médias de patógenos foram baixas quando comparadas ao leite. Utensílios de madeira da Canastra apresentaram contaminação levemente superior ao proposto nessa pesquisa para os patógenos avaliados, assim como o leite. Portanto, recomenda-se a correta higienização dos utensílios de madeira e adequada aplicação das BPF para que o leite fique com boa qualidade microbiológica. O início do processamento do queijo com matéria-prima de qualidade favorece o processo de maturação e diminui o aporte patogênico nos utensílios de madeira e fermento, oferecendo ao consumidor um produto autêntico e seguro.

### **Agradecimentos**

À CAPES e CNPq, pelo apoio financeiro. Ao Núcleo de Microscopia e Microanálise da UFV.

### **5. Referências**

- APHA. (2001). Microbiology of foods and animal feeding stuffs – horizontal methods for sampling techniques from surfaces using contact plates and swabs – ISO-18593:2004. Standard Methods for Examination of Dairy Products. 16th ed. Washington, D.C.
- Awad, S., Ahmed, N., & El Soda, M. (2007). Evaluation of isolated starter lactic acid bacteria in Ras cheese ripening and flavour development. *Food Chemistry*, 104, 1192-1199.
- Beuchat, L. R. & Golden, D. A. (1989). Antimicrobials occurring naturally in foods. *Food Technology*, 43, 134-142.
- Borelli, B. M., Ferreira, E. G., Lacerda, I. C. A., Franco, G. R., & Rosa, C. A. (2006). Yeast populations associated with the artisanal cheese produced in the region of

- Serra da Canastra, Brazil. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 22, 1115-1119.
- Brown, A. D. (1976). Microbial water stress. *Bacteriological Reviews*, 40, 803-846.
- Capdeville, I. & Nguyen, K. M. (1990). Kinetics and modelling of aerobic and anaerobic film growth. *Water Science and Technology*, 22, 149-170.
- Carmo, L. S., Dias, R. S., Linardi, V. R., Sena, M. J., Santos, D. A., Faria, M. E., Pena, E. C., Jett, M., & Heneine, L.G. (2002). Food poisoning due to enterotoxigenic strains of *Staphylococcus* present in Minas cheese and raw milk in Brazil. *Food Microbiology*, 19, 9-14.
- Casalta, E., Sorba, J-M., Aigle, M., & Ogier, J-C. (2009). Diversity and dynamics of the microbial community during the manufacture of Calenzana, an artisanal Corsican cheese. *International Journal of Food Microbiology*, 133, 243-251.
- Crow, V. L., Coolbear, T., Gopal, P. K., Martley, F. G., McKay, L. L., & Riepe, H. (1995). The role of autolysis of lactic acid bacteria in the ripening of cheese. *International Dairy Journal*, 5(8), 855-875.
- De Freitas, I., Pinon, N., Maubois, J-L., Lortal, S., & Thierry, A. (2009). The addition of a cocktail of yeast species to Cantalet cheese changes bacterial survival and enhances aroma compound formation. *International Journal of Food Microbiology*, 129, 37-42.
- De Man, J. C., Rogosa, M., & Sharpe, M. E. (1960). A medium for the cultivation of lactobacilli. *Journal of Applied Bacteriology*, 23, 130-135.
- Del Campo, G., Santos, J. L., Berregi, I., Velasco, S., Ibarburu, I., Dueñas, M. T., & Irastorza, A. (2003). Ciders produced by two types of presses and fermented in stainless steel and wooden vats. *Journal of the Institute of Brewing*, 109(4), 342-348.
- Dores, M. T. (2007). Queijo Minas artesanal maturado à temperatura ambiente e sob refrigeração. (Master's dissertation, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Brasil).

Disponível em: <[http://www.tede.ufv.br/tedesimplificado/tde\\_arquivos/39/TDE-2009-08-03T080615Z-1927/Publico/texto%20completo.pdf](http://www.tede.ufv.br/tedesimplificado/tde_arquivos/39/TDE-2009-08-03T080615Z-1927/Publico/texto%20completo.pdf)>. Acesso: 29 de junho, 2011.

EMATER – Empresa de Assistência Técnica e Extensão Rural do Estado de Minas Gerais. (2004). Queijo Minas Artesanal: Tradição e Qualidade que Revelam Minas. *Revista da EMATER – MG*, 80, 8-9.

Fadda, M. E., Mossa, V., Pisano, M. B., Delphano, M., & Cosentino, S. (2004). Occurrence and characterization of yeast isolated from artisanal Fiore Sardo cheese. *International Journal of Food Microbiology*, 95, 51-59.

Fleet, G. H. (1990). Yeasts in dairy products. *Journal of Applied Bacteriology*, 68, 199-211.

González, L., Sandoval, H., Sacristán, N., Castro, J. M., Fresno, J. M., & Tornadijo, M. E. (2007). Identification of lactic acid bacteria isolated from Genestoso cheese throughout ripening and study of their antimicrobial activity. *Food Control*, 18, 716-722.

Karnovsky, M. J. (1965). A formaldehyde-glutaraldehyde fixative of high osmolarity for use in electron microscopy. *The Journal of Cell Biology*, 27, 137A.

Kim, Y., Oh, S., & Kim, S. H. (2009). Released exopolysaccharide (r-EPS) produced from probiotic bacteria reduce formation of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 379, 324-329.

Licitra, G., Ogier, J. C., Parayre, S., Pediliggieri, C., Carnemolla, T. M., Falentin, H., Madec, M. N., Carpino, S., & Lortal, S. (2007). Variability of Bacterial biofilms of the “Tina” wood vats used in the Ragusano cheese-making process. *Applied Environmental Microbiology*, 73(21), 6980-6987.

Lortal, S., Di Blasi, A., Madec, M. N., Pediliggieri, C., Tuminello, L., Tanguy, G., Fauquant, J., Lecuona, Y., Campo, P., Carpino, S., & Licitra, G. (2009). Tina wooden vat biofilm: A safe and highly efficient lactic acid bacteria delivering system

in PDO Ragusano cheese making. *International Journal of Food Microbiology*, 132, 1-8.

Mafu, A. A., Plumety, C., Deschênes, L., & Goulet, J. (2011). Adhesion of Pathogenic Bacteria to Food Contact Surfaces: Influence of pH of Culture. *International Journal of Microbiology*, 2011, 1-9.

Mariani, C., Briandet, R., Chamba, J.-F., Notz, E., Carnet-Pantiez, A., Eyoug, R. N., & Oulahal, N. (2007). Biofilm Ecology of Wooden Shelves Used in Ripening the French Raw Milk Smear Cheese Reblochon de Savoie. *Journal of Dairy Science*, 90, 1653-1661.

Martins, J. M. (2006). Características físico-químicas e microbiológicas durante a maturação do queijo Minas artesanal da região do Serro. (Doctoral thesis, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Brasil). Disponível em: <[http://www.tede.ufv.br/tesesimplificado/tde\\_arquivos/38/TDE-2007-06-27T135144Z-596/Publico/texto%20completo.pdf](http://www.tede.ufv.br/tesesimplificado/tde_arquivos/38/TDE-2007-06-27T135144Z-596/Publico/texto%20completo.pdf)>. Acesso: 29 de junho, 2011.

Minas Gerais (a). 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. Disponível em: <<http://www.ima.mg.gov.br/component/search/?searchword=portaria+518&ordering=&searchphrase=all>>. Acesso: 04 de julho, 2011.

Minas Gerais (b). Lei 14.185, de 31 de janeiro de 2002. Dispõe sobre o processo de produção de queijo Minas artesanal. 2002. Disponível em: <[http://hera.almg.gov.br/cgi-bin/nph-brs?co1=e&d=NJMG&p=1&u=http://www.almg.gov.br/njmg/chama\\_pesquisa.asp&SECT1=IMAGE&SECT2=THESOFF&SECT3=PLUROFF&SECT6=HITIMG&SECT7=LINKON&l=20&r=1&f=G&s1=DECRETO 42645 2002.NORM.&SECT8=SOTEXTO](http://hera.almg.gov.br/cgi-bin/nph-brs?co1=e&d=NJMG&p=1&u=http://www.almg.gov.br/njmg/chama_pesquisa.asp&SECT1=IMAGE&SECT2=THESOFF&SECT3=PLUROFF&SECT6=HITIMG&SECT7=LINKON&l=20&r=1&f=G&s1=DECRETO 42645 2002.NORM.&SECT8=SOTEXTO)>. Acesso: 04 de julho, 2011.

Minas Gerais. Decreto nº 44.864, de 1º 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 de Queijo Minas Artesanal. Disponível em:

<[http://imanet.ima.mg.gov.br/nova/gce/outros\\_documentos/Decreto\\_44864.pdf](http://imanet.ima.mg.gov.br/nova/gce/outros_documentos/Decreto_44864.pdf)>.

Acesso: 04 de julho, 2011.

Randazzo, C. L., Pitino, I., Ribbera, A., & Caggia, C. (2010). Pecorino Crotonese cheese: Study of bacterial population and flavour compounds. *Food Microbiology*, 27, 363–374.

Silva Jr. E. A. (2001). *Manual de controle higiênico-sanitário em alimentos*. São Paulo: Varela.

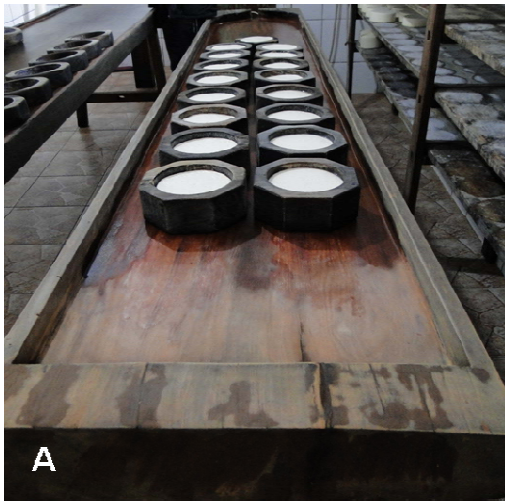
Settanni, L., Franciosi, E., Cavazza, A., Coconcelli, P.S., & Poznanski, E. (2011). Extension of Tosèla cheese shelf-life using non-starter lactic acid bacteria. *Food Microbiology*, 28, 883-890.

Solieri, L. & Giudici, P. (2008). Yeasts associated to Traditional Balsamic Vinegar: Ecological and technological features. *International Journal of Food Microbiology*, 125, 36-45.

Terzaghi, B. E. & Sandine, W. E. (1975). Improved medium for lactic streptococci and their bacteriophages. *Applied Environmental Microbiology*, 29, 807-813.

Trulear, M. G. & Characklis, W. G. (1982). Dynamics of biofilm processes. *Journal of Water Pollution Control Federation*, 54, 1288-1301.

Zmantar, T., Kouidhi, B., Miladi, H., Mahdouani, K., & Bakhrouf, A. (2010). A Microtiter plate assay for *Staphylococcus aureus* biofilm quantification at various pH levels and hydrogen peroxide supplementation. *New Microbiologica*, 33, 137-145.



A



B

Figura 1. (A) Mesa e formas de madeira da região do Serro. (B) Prateleiras de madeira da região do Serro.

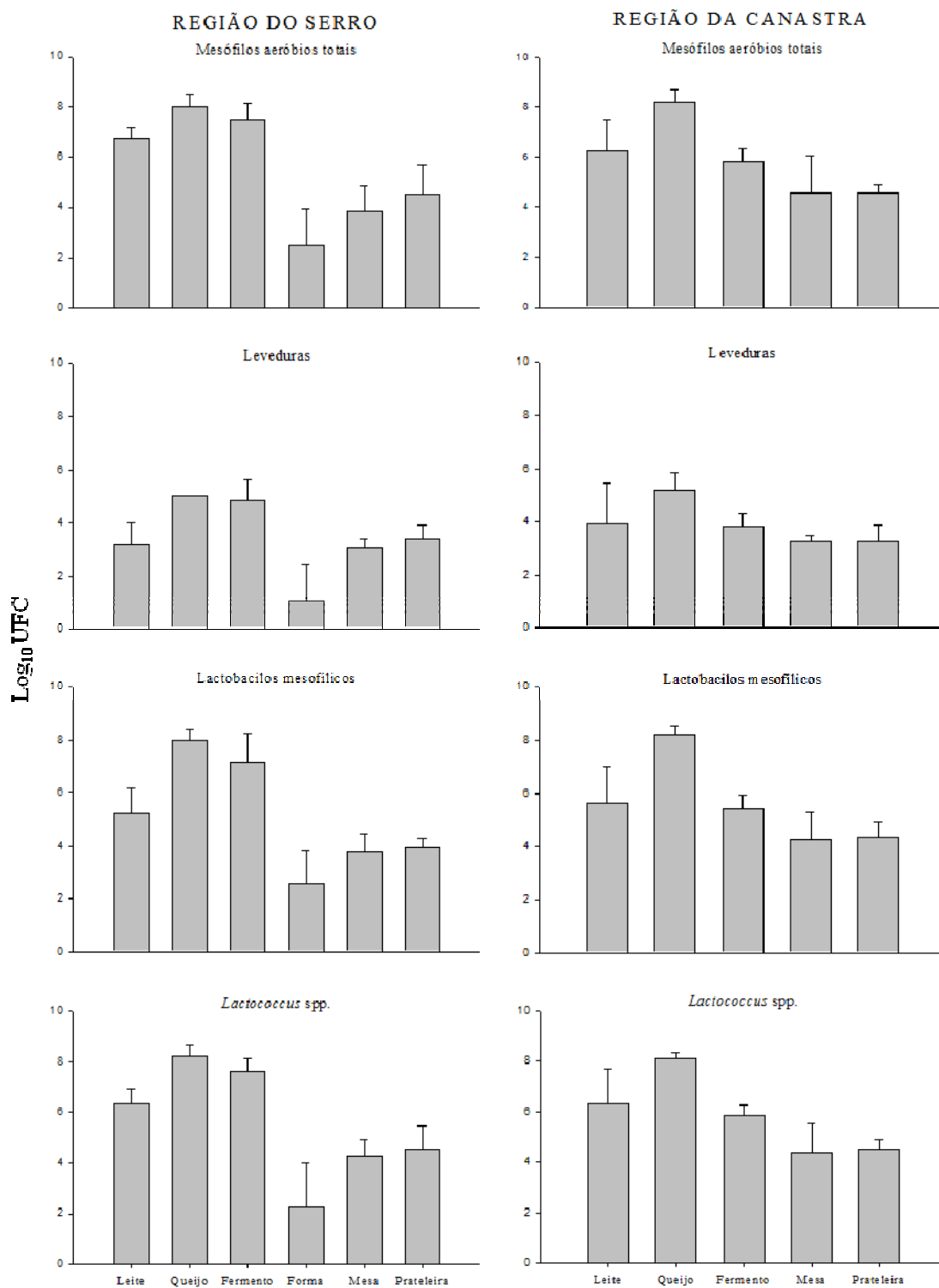


Figura 2. Médias da enumeração de mesófilos aeróbios totais, leveduras, lactobacilos mesofílicos e *Lactococcus* spp. das amostras do Serro e Canastra. Leite e fermento em log<sub>10</sub>UFC/mL, mesa, forma e prateleira em log<sub>10</sub>UFC/cm<sup>2</sup>, queijo em log<sub>10</sub>UFC/g.

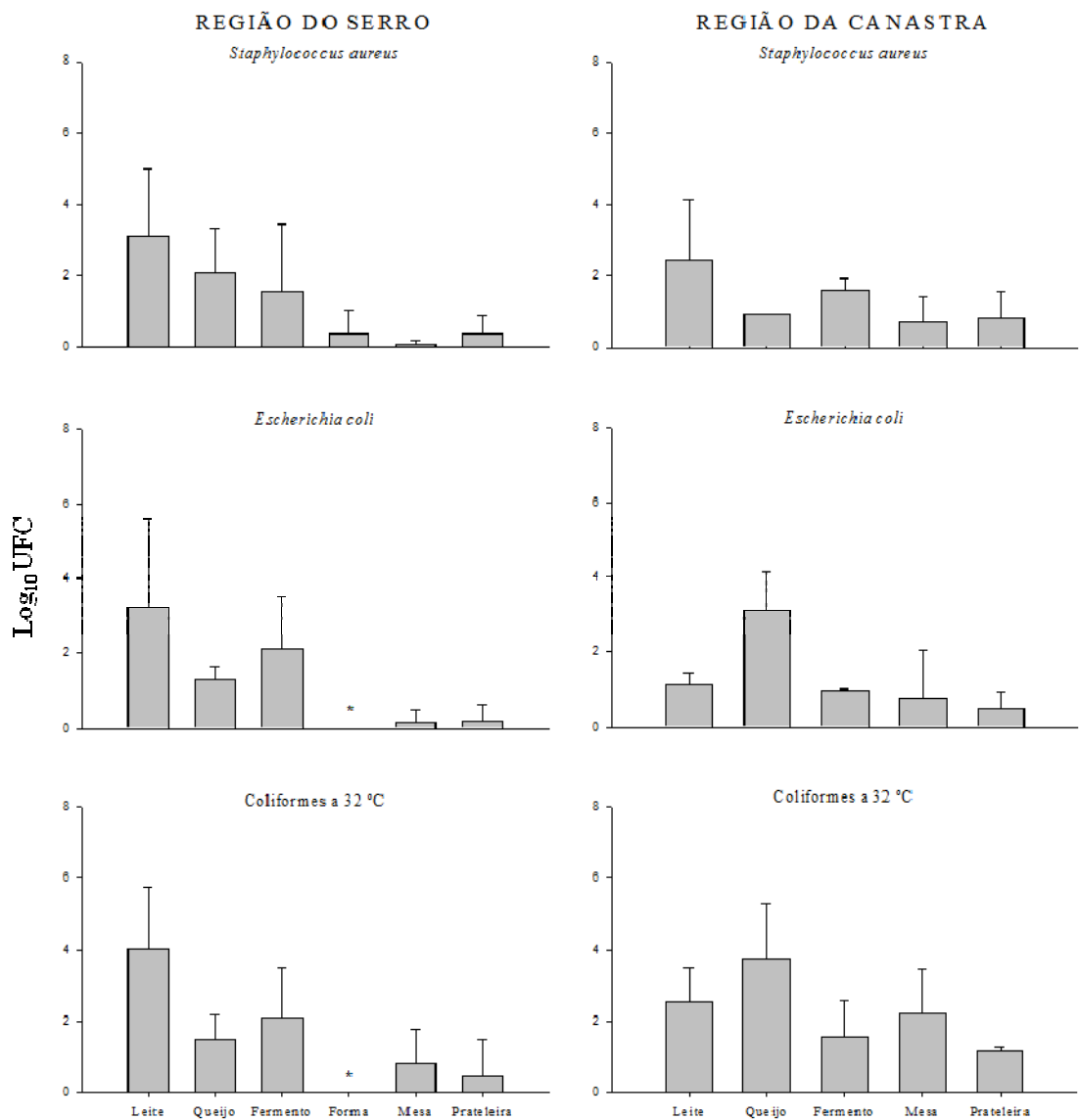


Figura 3. Médias da enumeração de *S. aureus*, *E. coli* e coliformes a 32 °C das amostras do Serro e Canastra. Leite e fermento em log<sub>10</sub>UFC/mL, mesa, forma e prateleira em log<sub>10</sub>UFC/cm<sup>2</sup>, queijo em log<sub>10</sub>UFC/g. \*Ausência de crescimento.

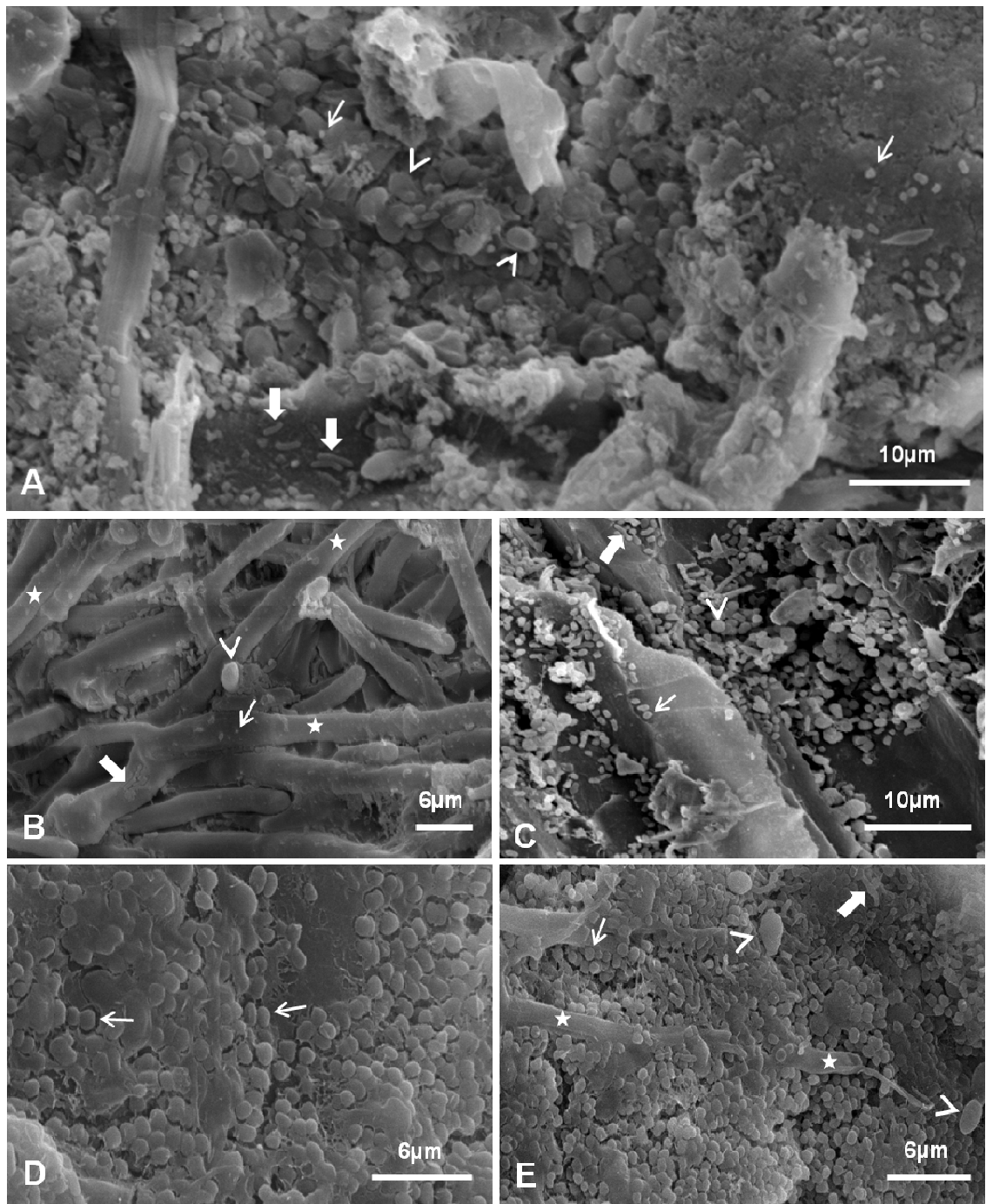


Figura 4. Microscopia eletrônica de varredura dos biofilmes dos utensílios de madeira do Serro: mesa (A), forma (B) e prateleira (C); Canastra: mesa (D) e prateleira (E). Cocos (setas finas), bacilos (setas largas), leveduras (cabeças de setas), fungos filamentosos (estrelas).

Tabela 1. Log<sub>10</sub> das contagens de *Lactobacillus* spp. e *Lactococcus* spp. em diferentes amostras na fabricação do queijo Minas artesanal nas regiões do Serro e Canastra

Amostras	Regiões	<i>Lactobacillus</i> spp.		<i>Lactococcus</i> spp.	
		Mínimo	Máximo	Mínimo	Máximo
Leite	Serro	4.13	6.46	5.53	7.08
	Canastra	4.27	6.93	4.72	7.26
Fermento	Serro	5.80	8.08	7.10	8.14
	Canastra	4.93	5.93	5.42	6.14
Forma	Serro	1.33	3.72	0.40	3.77
Mesa	Serro	2.58	4.47	3.49	5.12
	Canastra	3.59	5.42	3.54	5.69
Prateleira	Serro	3.91	4.44	3.78	5.86
	Canastra	3.98	5.00	4.29	4.93
Queijo	Serro	7.54	8.34	7.64	8.53
	Canastra	7.83	8.41	7.85	8.39

Leite e fermento em log<sub>10</sub>UFC/mL, biofilmes em log<sub>10</sub>UFC/cm<sup>2</sup> e queijo em log<sub>10</sub>UFC/g.

## Conclusões Gerais

O uso dos utensílios de madeira na fabricação do queijo Minas artesanal confere característica que são peculiares a esse produto. No entanto, devido a eliminação das formas e mesas de madeira pela legislação do Estado de Minas Gerais, considerou-se necessário a realização de estudos caracterizando microbiologicamente e a ultra estrutura dos biofilmes presentes nesses utensílios.

Contatou-se que os utensílios de madeira da região do Serro estavam dentro dos padrões propostos nessa pesquisa. Contudo, os produtores dessa região devem aplicar e manter as boas práticas de fabricação, sobretudo na etapa de ordenha, cujo leite apresentou elevadas contagens de micro-organismos patogênicos. A utilização de leite com qualidade microbiológica e a correta higienização dos utensílios, pode garantir um fermento endógeno de qualidade e, conseqüentemente, um queijo seguro para o consumidor, mantendo as características tradicionais do produto e assegurando a manutenção do “saber fazer” passado entre as gerações.

Produtores da região da Canastra devem ter maiores cuidados com a ordenha, para garantir um leite com baixas contagens de contaminantes, e ainda, higienizar corretamente os utensílios para assegurar que o queijo inicie a maturação com baixas contagens patogênicas e, assim, ao final desse processo, esteja dentro dos padrões microbiológicos exigidos pela legislação do Estado de Minas Gerais.

Sugere-se a elaboração de uma legislação que indique padrões microbiológicos para o fermento endógeno e para a contagem dos micro-organismos indicadores de segurança nas superfícies dos utensílios de madeira. E ainda, a reavaliação da legislação mineira vigente, quanto a possibilidade de utilização das formas e mesas de madeira, de modo a garantir a continuidade da tradição e das características tradicionais do queijo Minas artesanal.