



INSTITUTO FEDERAL DO NORTE DE MINAS - *CAMPUS* SALINAS
BACHARELADO EM ENGENHARIA DE ALIMENTOS

CRISTIANA FERREIRA DOS SANTOS
RAFAEL BATISTA DE FIGUEIREDO

QUALIDADE MICROBIOLÓGICA DE REQUEIJÃO MORENO
PRODUZIDO NA CIDADE DE SALINAS - MG

SALINAS - MG
DEZEMBRO - 2021

CRISTIANA FERREIRA DOS SANTOS
RAFAEL BATISTA DE FIGUEIREDO

QUALIDADE MICROBIOLÓGICA DE REQUEIJÃO MORENO
PRODUZIDO NA CIDADE DE SALINAS - MG

Trabalho apresentado à banca examinadora do curso de Bacharelado em Engenharia de Alimentos do IFNMG - *Campus* Salinas, como parte integrante das exigências para obtenção do título de Engenheiro(a) de Alimentos, sob a orientação da Prof^a. Dr^a. Bruna Castro Porto.

Aprovado em 22 de dezembro de 2021.

Prof. Dra. Juliana Zara Brondi Mendes
Membro da Banca Examinadora

Prof. M. Roberta Magalhães Dias Cardozo
Membro da Banca Examinadora

Prof^a. Dr^a. Bruna Castro Porto
Orientadora

SALINAS - MG
DEZEMBRO - 2021

SUMÁRIO

1. Introdução	6
2. Objetivos	7
2.1. Objetivo Geral	7
2.2. Objetivos Especificos	7
3. Revisão Bibliográfica	7
3.1. Queijo	7
3.1.1. Queijos artesanais	7
3.1.1.1. Requeijão moreno	9
3.1.2. Padrão microbiológico para queijo	9
4. Metodologia	12
4.1. Material	12
4.2. Identificação de produtores de requeijão moreno no Mercado Municipal de Salinas – MG.	12
4.3. Elaboração dos requeijões morenos com diferentes processamentos	12
4.4. Verificação da qualidade microbiológica	14
4.4.1. Detecção de <i>Salmonella</i> sp.	14
4.4.2. Determinação de estafilococos coagulase positiva	15
4.4.3 Determinação de coliformes totais e termotolerantes	16
5. Resultados e Discussão	17
6. Conclusão	20
7. Referências Bibliográficas	21

RESUMO

Muitos dos queijos produzidos no Brasil são advindos de produção artesanal. A importância econômica e social desta forma de produção é indiscutível. Por outro lado, também é de extrema importância a comercialização de alimentos inócuos para a população. O requeijão moreno é um queijo artesanal tradicional do norte de Minas Gerais, amplamente consumido e comercializado na cidade de Salinas - MG. Porém, sem o selo Arte que atesta a qualidade do produto artesanal para comercialização. Dessa forma, este trabalho objetivou investigar a qualidade microbiológica do requeijão moreno elaborado sob diferentes condições de processamentos e dos produtos comercializados no Mercado Municipal de Salinas - MG. Para isto, foram produzidas três formulações de requeijão moreno, duas a partir de leite cru (F1 e F2) e uma com leite pasteurizado (F3), e obtidas amostras de quatro produtores (C1, C2, C3, C4, todas produzidas com leite cru). De cada produto, já finalizado, foram retiradas 3 amostras, assim totalizando 21 amostras analisadas quanto a detecção de *Salmonella* sp., e contagens de estafilococos coagulase positiva, coliformes totais e termotolerantes. Somente as amostras C3 e C4 apresentaram presença de *Salmonella* sp. Todas as amostras não apresentaram estafilococos coagulase positiva. Apenas a amostra C3 apresentou contagem de coliformes termotolerantes ($3,6 \times 10^2$ NMP/mL). A partir dos resultados, pode-se observar que é possível obter requeijão moreno produzido com leite cru com qualidade microbiológica desde que executadas as práticas higiênico sanitárias corretamente.

Palavras-chave: enterobactérias; queijo com leite cru; queijo artesanal.

ABSTRACT

Requeijão moreno is a traditional artisanal cheese from the north of Minas Gerais, widely consumed and marketed in the city of Salinas - MG. However, it does not have the Arte seal that attests to the quality of the artisanal product for commercialization. The cheeses produced in Brazil from artisanal production such as requeijão moreno, have great economic and social relevance, the safety of these products is extremely important to ensure the health and well-being of consumers. Thus, this study aimed to investigate the microbiological quality of curd cheese made under different processing conditions and products sold at the Municipal Market of Salinas - MG. For this, three moreno requeijão formulations were produced, two from raw milk (F1 and F2) and one with pasteurized milk (F3), and samples were obtained from four producers (C1, C2, C3, C4, all produced with milk cru) and 3 samples were taken from each finished product, thus totaling 21 samples analyzed for the detection of *Salmonella* sp., and counts of coagulase positive staphylococci, total and thermotolerant coliforms. Only samples C3 and C4 showed the presence of *Salmonella* sp. All samples did not show coagulase positive staphylococci. Only the C3 sample showed thermotolerant coliform counts ($3,6 \times 10^2$ NMP/mL). From the results, it can be observed that it is possible to obtain curd cheese produced with raw milk with microbiological quality as long as the hygienic and sanitary practices are correctly performed.

Keywords: enterobacteria; cheese with raw milk; artisanal cheese.

1. Introdução

Define-se queijo como um produto que pode ser fresco ou maturado, produzido a partir da coagulação do leite, seguido pela separação parcial do soro, adicionado ou não de outras substâncias alimentícias permitidas de acordo com as suas especificidades (BRASIL, 1996). O mercado de queijos no Brasil é composto por um grande número de pequenos produtores, dos quais cerca de 40% são reconhecidos como produtores de queijos artesanais (SEBRAE, 2008). Queijo artesanal é o queijo obtido por métodos habituais que utiliza boas práticas de fabricação (BPF) e agropecuária (BPA) e possui apreciação territorial, regional ou cultural, de acordo com suas especificidades (BRASIL, 2019a).

A partir da lei do Selo Arte que permite o comércio de alimentos artesanais entre os estados brasileiros desde que os produtos sejam fiscalizados por órgãos de saúde pública dos Estados e do Distrito Federal (BRASIL, 2018), o governo de Minas Gerais, maior produtor de queijos artesanais do país, estabeleceu a lei nº 23157 de 2018 (MINAS GERAIS, 2018) e o decreto nº 48024 de 2020 (MINAS GERAIS, 2020), que designam queijo artesanal o produto elaborado com leite integral fresco, cru e com características de identidade e qualidade específicas.

No norte de Minas Gerais, o requeijão moreno, um queijo artesanal produzido nos Vales do Jequitinhonha e Mucuri (PINEDA *et al.*, 2021) é bastante consumido, entretanto, não são encontrados produtos comercializados com o Selo Arte, identificação que atestaria a qualidade do produto. A ingestão de queijo a partir de leite cru é frequentemente associada ao desenvolvimento de doenças veiculadas por alimentos (CORREIA *et al.*, 2017; SILVA; SILVA, 2013; AZEVEDO *et al.*, 2017). Sendo assim, verificou-se a necessidade de avaliar a qualidade microbiológica dos requeijões morenos comercializados na cidade de Salinas – MG e, testar a eficiência de diferentes processos com variado nível de adoção de práticas de inocuidade na microbiota patogênica de requeijão moreno.

2. Objetivos

2.1. Objetivo Geral

O objetivo do presente trabalho foi investigar a qualidade microbiológica do requeijão moreno elaborado sob diferentes condições de processamentos e do requeijão moreno comercializado no Mercado Municipal de Salinas – MG.

2.2. Objetivos Específicos

Os objetivos específicos foram:

- Identificar produtores de requeijão moreno no Mercado Municipal de Salinas – MG;
- Elaborar três requeijões morenos sob diferentes níveis de práticas de segurança do alimento;
- Verificar a qualidade microbiológica dos requeijões morenos elaborados no projeto e comercializados em Salinas - MG quanto à presença/ausência de *Salmonella* sp., contagem de estafilococos coagulase positiva, e contagem de coliformes totais e termotolerantes.

3. Revisão bibliográfica

3.1. Queijo

De acordo com a portaria 146 de 1996 do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), ainda vigente, queijo é definido como um produto fresco ou maturado obtido através da separação parcial do soro do leite ou leite reconstituído, ou de soros lácteos, submetidos ao processo de coagulação pelo coalho, por enzimas específicas, por bactéria específica ou por ácidos orgânicos com ou sem adição de outras substâncias alimentícias como especiarias, condimentos, aditivos especificamente indicados, aromas e corantes, cuja base láctea não possua proteína e/ou gordura não láctea (BRASIL, 1996).

3.1.1. Queijos artesanais

Segundo a lei nº. 13.860 de 2019 (BRASIL, 2019b), queijo artesanal é um produto obtido exclusivamente por métodos habituais, com apreciação territorial, regional ou cultural, de acordo o padrão específico para cada tipo e variedade, cuja produção deve obedecer às boas práticas de fabricação (BPF) e agropecuária (BPA). No Brasil existe uma ampla variedade de queijos artesanais, produzidos com leite de diferentes espécies animais, como bovinos,

bubalinos, ovinos e caprinos, sendo o leite bovino o mais utilizado. Dentre os tipos de queijos artesanais de origem brasileira, têm-se o queijo de manteiga; queijo creme; queijo curado; queijo minas artesanal da Serra da Canastra; queijo artesanal de Alagoa; queijo artesanal cabacinha da Região do Vale do Jequitinhonha; requeijão moreno, dentre outros (SLOW FOOD BRASIL, 2018; KAMIMURA *et al.*, 2019; ARAÚJO *et al.*, 2020).

As propriedades produtoras de queijo artesanal apresentam benefícios econômicos e sociais aos produtores e suas comunidades. Estes estabelecimentos são operacionalizados por famílias, gerando renda e mantendo a tradição por gerações, apesar da existência de muitos produtores informais com problemas em estabilizar no mercado. A sistematização e o aperfeiçoamento dessas unidades de manipulação são obstáculos para toda a sociedade brasileira. Uma forma eficiente de transpor esses obstáculos está na união formal dos produtores de queijos artesanais em associações e cooperativas para se fortalecerem e obterem melhores resultados perante as adversidades que as atividades rurais apresentam. Esse sistema de atuação coletiva exhibe diversas vantagens como uso comunitário de máquinas, equipamentos e veículos; força na reivindicação de benefícios e melhorias de fatores que impactam a vida do produtor e de sua família (exemplos: estradas, escolas, postos de saúde, dentre outros); ampliação da capacidade de escoamento da produção; aquisição de insumos e equipamentos com preços mais acessíveis; melhores prazos de pagamento; e, melhores condições de acesso ao mercado (EMBRAPA, 2021).

A regulamentação da lei do Selo Arte (BRASIL, 2018) permitiu que a qualificação para aquisição do selo fosse repassada aos órgãos de agricultura e pecuária estaduais e distrital. É função destes órgãos identificarem e caracterizarem o tipo de produto alimentício artesanal (de acordo com as peculiaridades e qualidades específicas) e seu processo produtivo exclusivamente artesanal, além da fiscalização do ponto de vista higiênico sanitário. Assim, cada unidade da federação determina suas regras para a produção de queijo artesanal. Alguns estados criaram sua própria legislação, como Minas Gerais, maior produtor de queijos artesanais do país, que estabeleceu a lei nº 23157 de 2018 (MINAS GERAIS, 2018) e o decreto nº 48024 de 2020 (MINAS GERAIS, 2020), que definem o queijo artesanal como um queijo elaborado com leite integral fresco, cru e com características de identidade e qualidade específicas. O processamento varia de acordo com a cultura regional, apropriado de técnicas habituais ou por inovações que atestem ao produto especificidades inerentes ao tipo de queijo artesanal, mas que fazem uso principal de técnicas manuais (MENESES, 2006). O selo Arte permite que produtos de origem animal, não somente queijos, possam: ser vendidos livremente em qualquer parte do território nacional, com diminuições burocráticas para registro e

comercialização; sejam submetidos a inspeção e fiscalização de natureza prioritariamente orientadora e, tornem-se facilmente identificados e reconhecidos por meio do selo único. Para os consumidores, isto representa uma melhoria na qualidade do produto artesanal que passa a respeitar as BPF e BPA (BRASIL, 2020).

Embora a legislação brasileira atual permita a produção e comercialização de queijos tradicionais elaborados a partir de leite cru, é importante estar clara a exigência quanto às BPA e BPF que devem ser respeitadas para que este alimento não seja propagador de doenças. Por serem elaborados com leite cru e não sofrerem processo de maturação, os queijos frescos artesanais são considerados um veículo frequente de patógenos gerando prejuízos à saúde e contradições em sua aceitação (CORREIA *et al.*, 2017). A instrução normativa nº 30 de 2013 consente que os queijos artesanais produzidos com leite cru sejam maturados por um período inferior a sessenta dias contanto que tenham inocuidade e qualidade atestadas (BRASIL, 2013).

3.1.1.1. Requeijão moreno

O requeijão moreno é um queijo artesanal típico do Norte de Minas Gerais produzido nos Vales do Jequitinhonha e Mucuri (PINEDA *et al.*, 2021). Seu fluxograma de produção básico consiste na coagulação do leite cru, retirada do creme, dessoragem da massa, salga, cozimento do creme, fusão da massa dessorada com a manteiga produzida a partir do creme previamente separado, moldagem e enformagem. Este queijo apresenta coloração amarronzada, com tonalidade que pode variar de mais clara a mais escura, dependendo do tempo de cozimento ou de fritura da manteiga usada para dar o acabamento final (SOBRAL *et al.*, 2013).

3.1.2. Padrão microbiológico para queijo

Os padrões microbiológicos para alimentos foram atualizados depois de 18 anos pela Resolução da Diretoria Colegiada (RDC) 331 de 2019 (BRASIL, 2019b), cujas listas estão apresentadas na Instrução Normativa nº 60 de 2019 (IN 60/2019c). Em queijos, a qualidade microbiológica é atestada quando, em uma amostra de 5 unidades pertencentes a um mesmo lote, todas apresentam ausência de *Salmonella* sp. e de enterotoxinas estafilocócicas, e no máximo duas unidades apresentam “qualidade intermediária” para estafilococos coagulase positiva e *E. coli*. A qualidade intermediária para estafilococos coagulase positiva ocorre quando o queijo apresenta de 10^2 a 10^3 UFC/g. Para *E. coli*, os valores dependem do teor de umidade do queijo. Queijo com umidade abaixo ou a partir de 46% apresentará qualidade intermediária quando apresentar de 10^1 a 10^2 UFC/g ou de 10^2 a 10^3 UFC/g, respectivamente (BRASIL, 2019c).

Dentre os microrganismos presentes em produtos lácteos que oferecem risco à saúde dos consumidores, destacam-se as enterobactérias, que incluem os gêneros *Salmonella* e *Escherichia* (FERNANDES; ANDREATTA; OLIVEIRA, 2006). *Salmonella* é um gênero pertencente à família Enterobacteriaceae, definido como bastonetes Gram-negativos, não esporogênicos, anaeróbios facultativos e oxidase negativos. As bactérias deste gênero possuem a forma de bacilos curtos, com largura de 0,7 a 1,5 μm e comprimento de 2,0 a 5,0 μm . A temperatura de crescimento varia de 5 a 45°C, com temperatura ótima de 37°C. O pH varia entre 4 e 9, com pH ideal de 7. A atividade de água mínima para crescimento é de 0,94 (D'AOUST; MAURER, 2007; ICMSF, 1996). Segundo o Ministério da Saúde (2021), a Organização Mundial de Saúde (OMS) considera as doenças veiculadas por alimentos (DVA) uma grande preocupação de saúde pública global e estima que, a cada ano, causem o adoecimento de uma a cada 10 pessoas. Além disso, DVA podem ser fatais, especialmente em crianças menores de 5 anos, causando 420 mil mortes. Na região das Américas, as doenças diarreicas são responsáveis por 95% das DVA. De acordo com Franco e Landgraf (2013), as doenças causadas por *Salmonella* se subdividem em três grupos: febre tifoide, causada por *Salmonella typhi*; febres entéricas causadas por *Salmonella paratyphi* (A, B e C); e as enterocolites ou salmoneloses causadas pelas demais espécies. Geralmente, os sintomas são caracterizados por diarreia, febre, dores abdominais e vômitos que surgem de 12 a 36 h após o contato com o microrganismo, cujos sintomas duram de um a quatro dias. Em um estudo realizado por Feitosa *et al.* (2003), foi encontrada, em queijos Coalho e Manteiga, a presença de *Salmonella* sp. em 9% e 15% das amostras analisadas, respectivamente.

A presença de estafilococos coagulase positiva nos alimentos aponta falhas de higiene na manipulação, evidenciando o não cumprimento das BPF, aumentando o risco do produto servir como veículo de intoxicação alimentar (SEIXAS *et al.*, 2013). A intoxicação alimentar mais comum é proveniente da ingestão de enterotoxinas de *Staphylococcus aureus* pré-formadas no alimento (HENNEKINNE *et al.*, 2012; TORTORA; FUNKE; CASE, 2012). No Brasil existem poucas informações sobre essa doença, mas sabe-se que causa vômitos, náuseas e diarreia, e a maioria dos casos não é notificada. Dados de 2000 a 2015 evidenciam que estafilococos foram responsáveis por 7,7% dos surtos de intoxicação alimentar ocorridos no Brasil (BRASIL, 2015). A identificação de enterotoxinas por *S. aureus*, de modo geral, é observada quando o alimento apresenta contagens a partir de 10^6 UFC/g. *S. aureus* também produz uma toxina que causa infecção grave, conhecida por síndrome do choque tóxico, caracterizada por febre alta, vômitos e até morte. A produção da enterotoxina do tipo sorológico A, responsável pela maioria dos casos de intoxicação estafilocócica, está constantemente correlacionado com a produção de uma

enzima que coagula o plasma. Por esta razão, essas bactérias são descritas como estafilococos coagulase positivas. Apesar de nenhum efeito patogênico poder ser atribuído diretamente à enzima, esta atua como indicadora de estafilococos provavelmente virulentos (TORTORA; FUNKE; CASE, 2012).

A constituição genética da *Salmonella* permite sua adaptação a uma variedade de ambientes e animais, incluindo hospedeiros mamíferos e não-mamíferos (SÁNCHEZ-VARGAS; ABU-EL-HAJJA; GÓMEZ-DUARTE, 2011), sendo o seu principal habitat o trato intestinal de humanos e animais. Pode-se citar como as principais fontes de *Salmonella* no ambiente, a água, o solo, as fezes de animais, os insetos e ratos, e as superfícies de equipamentos e utensílios de fábricas e cozinhas. Esta variedade de reservatórios e fontes de transmissão contribuem para a alta prevalência da infecção humana (SCALLAN *et al.*, 2011).

Os gêneros *Enterobacter* e *Klebsiella*, presentes no grupo de coliformes termotolerantes, não são de origem fecal, assim a detecção de coliformes a 45 °C em alimentos não representa contaminação fecal como representa a detecção de *E. coli*, apesar de esta poder estar inserida nos alimentos através de meios não fecais. A espécie *E. coli* possui algumas estirpes comprovadamente patogênicas para o homem e os animais, causando gastroenterites agudas, sobretudo em crianças. A presença de *E. coli* em leite é indicativa de contaminação fecal, e a ocorrência de toxi-infecção ocasionada por esta bactéria no alimento está associada ao consumo de leite cru (VANETTI, 2003). Existem seis categorias patogênicas de *E. coli* que causam infecção intestinal em homens e animais, sendo denominadas de *E. coli* diarreiogênicas que são diferenciadas pela presença de fatores de virulência como adesinas fimbriais e afimbriais, toxinas e invasinas, e classificadas em *E. coli* enteropatogênica (EPEC), *E. coli* enterotoxigênica (ETEC), *E. coli* enteroinvasora (EIEC), *E. coli* enterohemorrágica (EHEC) ou *E. coli* produtora da toxina de Shiga (STEC), *E. coli* enteroagregativa (EAEC) e *E. coli* aderente difusa (DAEC) (SOUZA, 2016). Os sintomas das doenças causadas por *E. coli* variam de diarreia leve e autolimitada até colite hemorrágica com diarreia grave sanguinolenta a depender do tipo de cepa envolvida (FRANCO; LANDGRAF, 2013).

Apenas leite com qualidade estável e segurança satisfatória pode ser usado na fabricação de queijos com leite cru. A quantificação da qualidade microbiológica tem seus entraves e a segurança do alimento depende, além da saúde e da qualidade do manejo do animal, do uso de boas práticas de higiene, incluindo ordenha, distribuição e armazenamento do leite (FERNANDES, 2014).

4. Metodologia

O estudo foi realizado nos meses de outubro a novembro de 2021 no Instituto Federal do Norte de Minas Gerais (IFNMG) – *Campus Salinas*.

4.1. Material

Para o presente estudo, três requeijões morenos (F1, F2 e F3, respectivamente) foram elaborados sob diferentes formas de processamento: a) requeijão produzido com leite cru e dessorado sob temperatura ambiente, com o objetivo de reproduzir o processo de elaboração tradicional do produto nas cidades do norte de Minas Gerais; b) requeijão produzido com leite cru e dessorado sob refrigeração a fim de verificar a elaboração de um produto artesanal utilizando uma prática higiênico-sanitária adicional; e, c) requeijão produzido com leite pasteurizado e dessorado sob refrigeração. Os leites cru e pasteurizado foram fornecidos pelo setor de laticínios e as amostras de requeijão moreno foram elaboradas no restaurante universitário da própria instituição. Quatro amostras comerciais (C1, C2, C3 e C4) foram adquiridas ou recebidas como doação de produtores no Mercado Municipal de Salinas – MG.

4.2. Identificação de produtores de requeijão moreno no Mercado Municipal de Salinas – MG.

Os produtores foram identificados através de uma visita ao mercado Municipal de Salinas – MG. Primeiramente, foram observados os *estandes* que estavam comercializando requeijão moreno, em seguida, foram realizadas três perguntas: a) se o(a) vendedor(a) era o(a) próprio(a) produtor(a) do produto; b) a frequência de produção e comercialização; e, c) a disponibilidade dele(a) em nos prover três amostras de um mesmo lote. Dessa forma, foram identificados quatro produtores que se propuseram a contribuir com o trabalho.

4.3. Elaboração dos requeijões morenos com diferentes processamentos

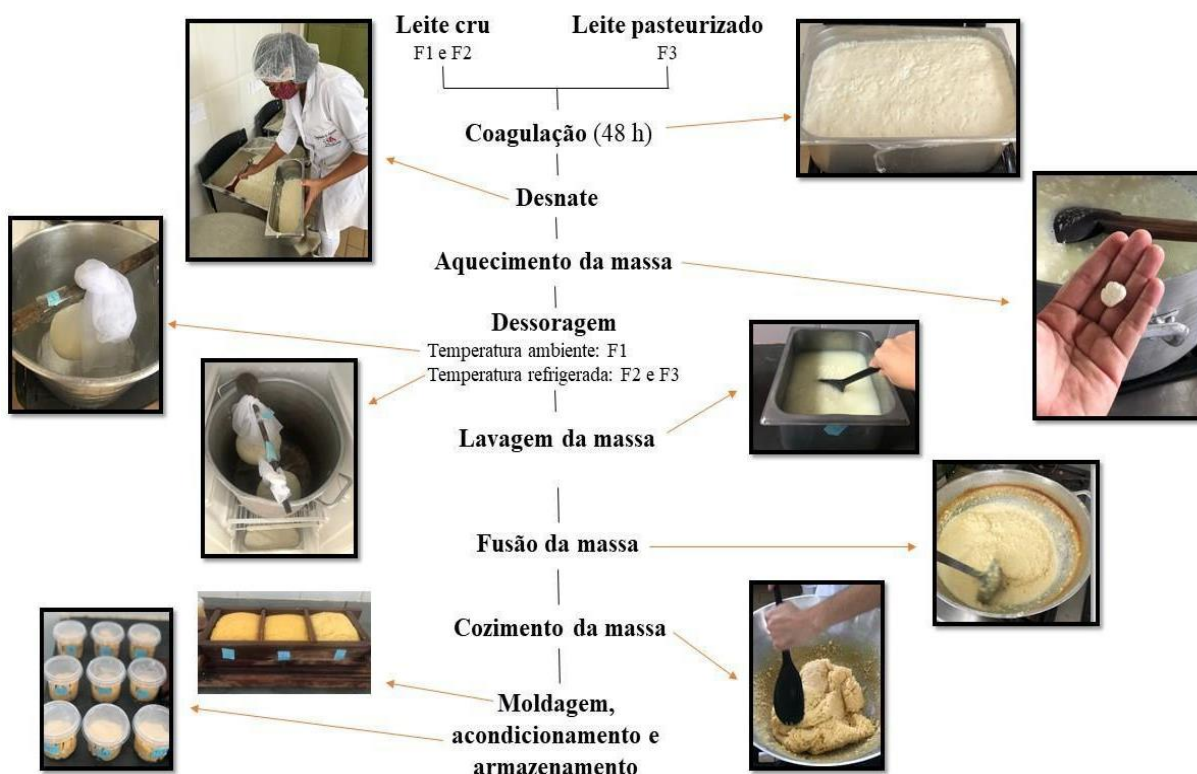
Os requeijões foram preparados com diferentes condições higiênico sanitárias e foram denominados F1, F2 e F3. As etapas que os diferenciaram foram indicadas com o código da amostra. Inicialmente, realizou-se a higienização das cubas de aço inoxidável e do copo plástico medidor através de limpeza com detergente neutro (Barbarex, Brasil) e sanitização com álcool 70% (v/v) (IFNMG, Brasil). Após secagem das três cubas, adicionou-se 20 L de leite cru (F1 e F2) ou pasteurizado (F3) em cada cuba para obtenção das três formulações. As cubas foram

cobertas com filme de policloreto de vinila (PVC) (Bandeirante, Brasil) e deixadas em temperatura ambiente para acidificação natural do leite com consequente coagulação por 48 h.

Antes de prosseguir com a formulação, todos os utensílios e equipamentos utilizados nas etapas seguintes foram lavados com detergente neutro (Barbarex, Brasil), sanitizados com água clorada Q-Ótimo (Officer, Brasil) de acordo com as instruções do fabricante e enxaguados com água potável. Após a coagulação do leite, observou a formação de três fases: superior (nata), intermediária (coágulo) e inferior (soro de leite). Primeiramente, a nata foi retirada com auxílio de escumadeira, acondicionada em cuba de aço inoxidável identificada com a respectiva formulação e armazenada sob refrigeração ($\sim 8^{\circ}\text{C}$). Posteriormente, retirou-se o coágulo e o levou para o aquecimento com uma parte do soro ($\sim 2\text{ L}$) até formar uma massa com liga. Após o aquecimento, a massa foi envolvida com tecido de nylon ($100\text{ cm} \times 60\text{ cm}$) para ser dessorada. A formulação F1 foi dessorada em temperatura ambiente e as formulações F2 e F3 foram dessoradas sob refrigeração ($\sim 8^{\circ}\text{C}$) durante 24 h.

Após dessoragem, a massa foi fragmentada manualmente, colocada em água potável quente para lavagem ($\sim 1\text{ L}$) e dessorada no mesmo tecido de nylon por 1 h. Em seguida, 7 L de leite cru foram submetidos a ebulição por 20 min. e a massa dessorada, novamente fragmentada manualmente, foi adicionada ao leite em temperatura de ebulição. Paralelamente a este processo, as natas foram batidas em liquidificador industrial com água gelada filtrada por 1 min. e 10 s., até a obtenção de um creme firme. Posteriormente, o creme foi lavado com água gelada filtrada até a obtenção de uma água de lavagem límpida. Logo após, o creme foi aquecido para remoção da água remanescente, e adicionado de 14 g de sal (NaCl) para a obtenção da manteiga.

Após o tempo de cocção da massa, esta foi dessorada novamente com o tecido de nylon por $\sim 30\text{ min}$. Em seguida, a massa foi fragmentada e aquecida em recipiente de aço inoxidável com 15 cm de profundidade juntamente com a manteiga para fusão da massa. Durante este período, a massa foi constantemente amassada de forma uniforme até desgrudar do fundo do recipiente de aço inoxidável. Por fim, realizou-se o processo de moldagem em fôrmas de material amadeirado, esperou-se esfriar, as amostras foram acondicionadas em embalagens de polipropileno e armazenadas sob refrigeração ($\sim 8^{\circ}\text{C}$). O diagrama ilustrado do processamento das três formulações está apresentado na Figura 1.



Nota: F1- requeijão produzido com leite cru e dessorado sob temperatura ambiente, com o objetivo de reproduzir o processo de elaboração tradicional do produto nas cidades do norte de Minas Gerais; F2 - requeijão produzido com leite cru e dessorado sob refrigeração a fim de verificar a elaboração de um produto artesanal utilizando uma prática higiênico sanitária adicional; F3 - requeijão produzido com leite pasteurizado e dessorado sob refrigeração.

Figura 1. Fluxograma do processo de elaboração de requeijão moreno com três diferentes formulações F1, F2 e F3.

4.4. Verificação da qualidade microbiológica dos requeijões morenos

Foram obtidas três amostras de cada um dos três processos de elaboração de requeijão moreno realizados no projeto (F1, F2 e F3) e três amostras de cada um dos quatro produtores de requeijão moreno identificados no Mercado Municipal de Salinas - MG (C1, C2, C3 e C4), totalizando 21 amostras que foram analisadas quanto a detecção de *Salmonella* sp. e determinação de estafilococos coagulase positiva, coliformes totais e termotolerantes.

4.4.1. Detecção de *Salmonella* sp.

Para a detecção de *Salmonella* sp. foram utilizados os métodos ISO 6579 para as etapas de pré-enriquecimento, enriquecimento seletivo, plaqueamento diferencial e confirmação sorológica (ISO, 2007 apud SILVA *et al.*, 2018), e BAM/FDA:2016 para a confirmação bioquímica (ANDREWS *et al.*, 2016). Inicialmente, foi realizado o pré-enriquecimento, em que

25 g da amostra foram diluídos em 225 mL de água peptonada tamponada, homogeneizados em stomacher e incubados a 37 ± 1 °C por 18 ± 2 h. Em seguida, foi realizado o enriquecimento seletivo, transferindo-se 0,1 mL do caldo de pré-enriquecimento para 10 mL de caldo Rappaport – Vassilidis Soja (RVS) (HIMEDIA, Índia) e 1,0 mL para 10 mL de caldo Tetrionato Muller Kauffmann Novobiocina (MKTTn) (MED, Brasil). Os tubos de caldo RVS foram incubados a $41,5 \pm 1$ °C por 24 ± 3 h e os tubos de caldo MKTTn a 37 ± 1 °C/ 24 ± 3 h. Após a incubação foi feito o plaqueamento diferencial.

De cada cultura em RVS e MKTTn, estriou-se uma alçada em placas previamente preparadas de ágar Xilose Lisina Desoxicolato (XLD) (SIGMA-ALDRICH, Brasil) e ágar Verde Brilhante (TM MÉDIA, Índia). As placas foram incubadas invertidas a 37 ± 1 °C por 24 ± 3 h. Posteriormente, verificou-se o desenvolvimento de colônias típicas de *Salmonella* sp.

Em cada placa inoculada foram marcadas até cinco colônias típicas para confirmação. As colônias foram estriadas em tubos de ágar Nutriente (NA) inclinados (TM MÉDIA, Índia) e incubadas a 37 ± 1 °C por 24 ± 3 h. Após a incubação foi realizada a confirmação bioquímica. Para esta etapa, cada colônia em ágar nutriente foi inoculada em tubos de ágar Tríplice Açúcar Ferro (TSI) (TM MÉDIA, Índia) e ágar Lisina Ferro (LIA) (HIMEDIA, Índia) inclinados, que foram incubados a 37 ± 1 °C por 24 ± 3 h. No caso de teste positivo, as colônias foram submetidas a confirmação por sorologia flagelar. Cada colônia foi inoculada em ágar nutriente (TM MÉDIA, Índia) semissólido e incubada a 37 ± 1 °C por 24 ± 3 h. Após incubação, foram marcados dois quadrados de aproximadamente 2 cm² em uma lâmina de vidro estéril, uma gota de solução salina estéril foi colocada em um quadrado e uma gota do antissoro poli H (PROBAC, Brasil) no outro. Em seguida, uma alçada da colônia foi emulsionada nos dois quadrados, a lâmina foi segurada contra um fundo preto bem iluminado e foi observada a ocorrência de aglutinação indicando teste positivo para *Salmonella* sp.

4.4.2. Determinação de estafilococos coagulase positiva

Para a determinação de estafilococos coagulase positiva, o método utilizado foi o plaqueamento ISO 6888-1:1999/Amd 1:2003 (ISO, 1999 apud SILVA *et al.* 2018). Inicialmente, a partir do caldo de pré-enriquecimento (diluição 10^{-1}) obtido na seção 4.4.1 foram realizadas as diluições 10^{-2} e 10^{-3} , inoculando 1 mL da diluição antecedente em 9 mL de água peptonada tamponada. Uma alíquota de 0,1 mL de cada diluição de cada amostra de requeijão moreno foi inoculada em placas de ágar Baird-Parker (BP) (TM MÉDIA, Índia) suplementado com gema de ovo com telurito (TM MÉDIA, Índia). O inóculo foi espalhado com alça de Drigaslski até que todo o líquido fosse absorvido pelo meio de cultura.

As placas foram incubadas invertidas a 35 ± 1 °C/ 48 ± 2 h. Cinco colônias típicas e/ou atípicas (quando não ocorreu a contagem mínima de colônias típicas) foram submetidas ao teste de coagulase. Para este teste, cada colônia foi inoculada em tubo contendo caldo Brain Heart Infusion (BHI) (HIMEDIA, Índia) e incubada a 35 ± 1 °C/ 48 ± 2 h.

Após incubação, 0,1 mL da cultura e 0,3 mL de coagulase plasma EDTA (BBL, Brasil) foram adicionados em tubos estéreis, incubados a $35-37$ °C/ $4 - 6$ h e observou-se a formação de coágulos nos tubos. Tubos com formação de coágulo em mais da metade do volume original do líquido foram considerados na contagem de estafilococos coagulase positiva. Para o cálculo do resultado foi utilizada a Equação 1.

$$UFC/g = \frac{\sum[(\frac{b_1 \cdot C_1}{A_1}) + (\frac{b_a \cdot C_a}{A_a})]}{[v \cdot (n_1 + 0,1 \cdot n_2) \cdot d]}$$

Onde, b é o número de típicas (b_1) ou atípicas (b_a) confirmadas, dentre as que foram submetidas à confirmação; C é o número de colônias típicas (C_1) ou atípicas (C_a) presentes em cada placa selecionada para contagem; A é o número de colônias típicas (A_1) ou atípicas (A_a) submetidas à confirmação; v é o volume inoculado em cada placa; n_1 é o número de placas contadas da primeira diluição selecionada; n_2 é o número de placas contadas da segunda diluição; e, d é a primeira diluição retida para contagem.

As contagens de *S. aureus* apresentadas na Tabela 2 foram obtidas através da média aritmética dos valores de C_1 e C_a isolados ou em conjunto.

4.4.3. Determinação de coliformes totais e termotolerantes

Na determinação de coliformes totais e termotolerantes foi utilizado o método do Número Mais Provável (NMP) APHA 9:2015 (KORNACKI *et al.*, 2015). As mesmas diluições 10^{-1} , 10^{-2} e 10^{-3} descritas na seção 4.4.2 foram utilizadas nesta análise. Uma alíquota de 1 mL das três diluições foi inoculada em cada três tubos contendo 10 mL de caldo Lauril Sulfato Triptose (LST) (LAB M, Reino Unido). Os tubos de LST foram incubados a $35 \pm 0,5$ °C/ $24-48$ h e observado se houve crescimento com produção de gás, indicando resultado positivo para o teste presuntivo de coliformes totais. Para o teste confirmativo de coliformes totais, 1 mL de cada tubo LST positivo foi inoculado em tubo contendo 10 mL de caldo Bile Verde Brilhante (VB) (TM MÉDIA, Índia) e incubado a $35 \pm 0,5$ °C/ $24-48$ h. Resultado positivo foi obtido quando observado crescimento com produção de gás. Os tubos de LST que apresentaram resultado positivo para coliformes totais prosseguiram para a análise de coliformes termotolerantes, em que 1 mL de cada tubo LST foi inoculado em tubo com 10 mL de caldo EC (TM MÉDIA, Índia)

e incubado a $45,5 \pm 0,2$ °C por 24 ± 2 h. A identificação de crescimento com produção de gás em caldo EC, confirmou a contagem de coliformes termotolerantes.

Os resultados foram obtidos através da Tabela de NMP apresentada por Silva *et al.* (2018) e Blodgett (2010) de NMP para série de três tubos com quantidade inoculada de 0,1 - 0,01 e 0,001 g.

5. Resultados e Discussão

Na Tabela 1 estão apresentados os resultados da análise microbiológica de requeijão moreno obtidos no presente estudo (F1, F2 e F3) e comercializados no Mercado Municipal de Salinas – MG (C1, C2, C3 e C4).

Apesar de não terem sido investigadas cinco unidades de cada amostra de requeijão moreno, foi possível fazer uma comparação entre as amostras em relação aos microrganismos e resultados considerados pela IN60/2019 (BRASIL, 2019c). Todas as amostras formuladas no presente estudo (F1, F2 e F3) apresentaram ausência de *Salmonella* sp., ausência de *E. coli* e ausência de estafilococos coagulase positiva (Tabela 1). Embora não tenha sido realizada a quantificação de enterotoxinas estafilocócicas nestas amostras, a quantificação de colônias típicas e atípicas presentes nessas formulações ($<10^2$ UFC/g) sugere a ausência destas substâncias que ocorrem, de maneira geral, quando apresenta contagens a partir de 10^6 UFC/g (TORTORA; FUNKE; CASE, 2012). Com este resultado, pode-se supor que é possível gerar um requeijão moreno com qualidade microbiológica a partir de leite cru (F1 e F2), se executadas as BPF básicas como higiene pessoal, e, higiene de utensílios, equipamentos e instalações. Este comportamento está relacionado a este tipo de queijo e não deve ser estendido para os demais queijos elaborados a partir de leite cru, visto que o requeijão moreno é um produto que passa por diversos processos térmicos que contribuem para este resultado. Cada queijo artesanal tem suas especificidades de processo, o que faz com que cada caso deva ser analisado isoladamente.

Duas amostras comerciais (C1 e C2) apresentaram os mesmos resultados para *Salmonella* sp. (ausência) e estafilococos coagulase positiva ($<1,0$ UFC/g) quando comparados às amostras formuladas (F1, F2 e F3), e, mesmo se diferenciando na contagem de *S. aureus* (Tabela 2), também pode-se sugerir ausência de enterotoxinas estafilocócicas devido a contagem inferior a 10^6 UFC/g (TORTORA; FUNKE; CASE, 2012). Entretanto, devido a comercialização do requeijão moreno em temperatura ambiente por parte de todos os produtores, esse limite poderia ter sido facilmente ultrapassado até o final da sua vida de prateleira. A contagem elevada de *S. aureus* nas amostras recém-produzidas sugere a deficiência de práticas higiênicas sanitárias por parte dos produtores dos requeijões C1 e C2. A mesma hipótese se aplica aos produtores das

amostras C3 e C4 que, além de apresentarem elevada contagem de *S. aureus* (Tabela 2), apresentaram *Salmonella* sp. tornando os produtos impróprios para comercialização.

Tabela 1. Análise microbiológica dos requeijões morenos elaborados no projeto (F1, F2 e F3) e comercializados em Salinas - MG (C1, C2, C3 e C4) quanto à presença/ausência de *Salmonella* sp., e contagem de estafilococos coagulase positiva, coliformes totais e termotolerantes.

Amostra	Repetição	<i>Salmonella</i> sp.	Estafilo. coag. positiva (UFC/g)	C. totais (NMP/g)	C. termo. (NMP/g)
F1	1	Ausência	$<1,0 \times 10^0$	$<3 \times 10^0$	-
	2	Ausência	$<1,0 \times 10^0$	$<3 \times 10^0$	-
	3	Ausência	$<1,0 \times 10^0$	$<3 \times 10^0$	-
F2	1	Ausência	$<1,0 \times 10^0$	$<3 \times 10^0$	-
	2	Ausência	$<1,0 \times 10^0$	$<3 \times 10^0$	-
	3	Ausência	$<1,0 \times 10^0$	$<3 \times 10^0$	-
F3	1	Ausência	$<1,0 \times 10^0$	$<3 \times 10^0$	-
	2	Ausência	$<1,0 \times 10^0$	$3,6 \times 10^0$	$<3 \times 10^0$
	3	Ausência	$<1,0 \times 10^0$	$<3 \times 10^0$	-
C1	1	Ausência	$<1,0 \times 10^0$	$<3 \times 10^0$	-
	2	Ausência	$<1,0 \times 10^0$	$<3 \times 10^0$	-
	3	Ausência	$<1,0 \times 10^0$	$<3 \times 10^0$	-
C2	1	Ausência	$<1,0 \times 10^0$	$<3 \times 10^0$	$<3 \times 10^0$
	2	Ausência	$<1,0 \times 10^0$	$2,3 \times 10^1$	$<3 \times 10^0$
	3	Ausência	$<1,0 \times 10^0$	$9,2 \times 10^0$	$<3 \times 10^0$
C3	1	Ausência	$<1,0 \times 10^0$	$2,8 \times 10^1$	$<3 \times 10^0$
	2	Ausência	$<1,0 \times 10^0$	$1,1 \times 10^3$	$3,6 \times 10^{0*}$
	3	Presença	$<1,0 \times 10^0$	$4,6 \times 10^2$	$<3 \times 10^0$
C4	1	Ausência	$<1,0 \times 10^0$	$1,5 \times 10^1$	$<3 \times 10^0$
	2	Presença	$<1,0 \times 10^0$	$<3 \times 10^0$	-
	3	Ausência	$<1,0 \times 10^0$	$<3 \times 10^0$	-

Legenda: Estafilo. coag. Positiva = estafilococos coagulase positiva; C. totais = coliformes totais; C. termo. = coliformes termotolerantes; - = análise não realizada; *Foi realizado o estriamento dessa cultura em placa de ágar eosina azul de metileno e foi observado resultado presuntivo para *E. coli*.

A amostra com a qualidade mais comprometida foi a C3 que além de apresentar *Salmonella* sp., apresentou cepa indicativa de *E. coli* (Tabela 1) e contagem de *S. aureus* acima de 1×10^6 UFC/g, aumentando a probabilidade de conter enterotoxinas estafilocócicas. Dessa forma, os produtos elaborados por este produtor representam um grande perigo para a saúde pública da cidade de Salinas – MG e região.

Tabela 2. Contagem de *Staphylococcus aureus* dos requeijões morenos comercializados em Salinas - MG (C1, C2, C3 e C4).

Amostra	Repetição	Contagem de <i>S. aureus</i> (UFC/g)		
		Colônias típicas	Colônias atípicas	Total
C1	1	$9,0 \times 10^3$	$3,6 \times 10^4$	$4,5 \times 10^4$
	2	$6,5 \times 10^4$	$3,9 \times 10^5$	$4,6 \times 10^5$
	3	$<1 \times 10^4$	$4,3 \times 10^5$	$4,3 \times 10^5$
C2	1	$<1 \times 10^2$	$<1 \times 10^2$	$<1 \times 10^2$
	2	$<1 \times 10^2$	$<1 \times 10^2$	$<1 \times 10^2$
	3	$5,5 \times 10^3$	$1,7 \times 10^5$	$1,7 \times 10^5$
C3	1	Incontável	Incontável	Incontável
	2	$2,4 \times 10^6$ (est.)	$6,9 \times 10^6$ (est.)	$9,3 \times 10^6$ (est.)
	3	Incontável	Incontável	Incontável
C4	1	$3,7 \times 10^4$	$4,0 \times 10^4$	$7,6 \times 10^4$
	2	$1,6 \times 10^4$	$9,5 \times 10^3$	$2,5 \times 10^4$
	3	$1,9 \times 10^4$	$1,9 \times 10^4$	$3,7 \times 10^4$

Legenda: est. = valor estimado devido a utilização do método de contagem por quadrante.

Quando se compara os resultados obtidos para os requeijões elaborados no estudo (F1, F2 e F3) que se diferenciaram em relação ao nível de adoção de práticas higiênicas sanitárias, observa-se que a formulação F3, elaborada com leite pasteurizado e dessorada sob refrigeração, apresentou contagem de coliformes totais de $3,6 \times 10^2$ NMP/g (o que corresponde a 1 tubo positivo em 27 inoculados) (Tabela 1), sugerindo possível contaminação durante a análise microbiológica e não contaminação da amostra.

Borges *et al.* (2003) detectaram altos níveis de contaminação por *Salmonella* spp. em queijos de coalho produzidos no estado do Ceará, em sua maioria, de forma artesanal a partir de leite cru e submetidos a temperaturas de aquecimento que variam de 45 a 50 °C. Das 43 amostras estudadas, a presença de *Salmonella* spp. foi detectada em 15 amostras (34,9%).

Na análise de estafilococos coagulase positiva, todas as amostras de requeijão moreno obtiveram resultados satisfatórios (<1 UFC/g) (Tabela 1). Resultado semelhante foi encontrado por Silva (2020) que, ao realizar a contagem de estafilococos coagulase positiva em queijo Macururé produzido com leite cru em Jacaré dos Homens, obteve valores dentro dos limites da legislação vigente para queijos de média umidade, encontrando valores $<10^2$ UFC/g.

Sabe-se que microrganismos patogênicos não esporulados como *Salmonella* sp., *S. aureus* e *E. coli* são facilmente destruídos pelo processo de pasteurização convencional (aquecimento que utiliza temperaturas inferiores a 100 °C por alguns minutos) (FELLOWS, 2006). Durante o processamento de requeijão moreno, é possível identificar diversas etapas de aquecimento mais intensas que processos de pasteurização. Dessa forma, acredita-se que as contaminações encontradas nos requeijões comerciais foram, majoritariamente, originadas de contaminação pós-processo, como nas etapas de moldagem, acondicionamento e manuseio pós-processo.

O comerciante C3 obteve valores elevados de coliformes totais que atingiram $1,1 \times 10^3$ NMP/g. De forma semelhante, Andrade *et al.* (2018), que avaliaram a qualidade microbiológica de queijos minas tipo frescal produzidos a partir de leite cru comercializados nas feiras livres do município de Unaí - MG, obtiveram valores elevados de coliformes totais chegando a $1,1 \times 10^3$ NMP/g em suas análises.

De acordo com Santana *et al.* (2008), com base nos limites da RDC 12 de 2001, já revogada, que apresentava limite de tolerância de coliformes termotolerantes de 5×10^2 NMP/g de amostra, verificaram que 93,3% dos queijos analisados na cidade de Aracaju - SE não estavam aptos à comercialização e, conseqüentemente, ao consumo humano. Os valores encontrados no estudo de Santana *et al.* (2008) assemelham-se aos apresentados também por Loguercio *et al.* (2001) que observaram que 93,3% dos queijos minas frescais artesanais, comercializados na cidade de Cuiabá - MT, estavam fora dos padrões da legislação brasileira vigente (coliformes termotolerantes acima de 10^2 NMP/g). Sendo assim, observa-se que é preciso obter queijos com qualidade microbiológica a partir de leite cru, mas que também é comum encontrar contaminação nestes produtos, sinalizando a importância de maior atuação por parte dos órgãos fiscalizadores.

Queijo de leite cru é comercializado no mercado brasileiro e nas ruas e consumido por grande parte da população. Por outro lado, a fiscalização é deficiente, o que faz do queijo um veículo potencial para doenças patogênicas.

6. Conclusão

Os requeijões morenos produzidos no presente estudo mostraram que implantações de práticas higiênico-sanitárias previstas nas Boas Práticas de Fabricação e Boas Práticas Agropecuárias, juntamente com as etapas de aquecimento utilizadas no fluxograma de processo destes produtos, possibilitam a sua adequação ao padrão microbiológico que atesta a sua segurança. Também foi evidente a necessidade de melhoria do processo produtivo de requeijão

moreno por parte dos produtores da cidade de Salinas – MG. Estes resultados são importantes e servem de referência para que as autoridades de saúde pública federais, estaduais e municipais possam colocar em prática ações educativas e punitivas mais efetivas para o controle sanitário e qualidade dos queijos artesanais produzidos e comercializados na região.

7. Referências Bibliográficas

- ANDRADE, K.A, et al. Qualidade microbiológica de queijos comercializados nas feiras livres do município de Unaí, MG, Brasil. **55ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Zootecnia**, Goiânia, 2018.
- ANDREWS, W. H, et al. **Bacteriological Analytical Manual (BAM)** on line. FDA 2016. Chap. 5. Disponível em: <<https://www.fda.gov/food/laboratory-methods-food/bam-chapter-5-salmonella>>. Acesso em: 10 dez. 2021.
- ARAÚJO, J. P. A, et al. Uma análise histórico-crítica sobre o desenvolvimento das normas brasileiras relacionadas a queijos artesanais. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 72, n. 5, p. 1845-1860, 2020.
- ASPENGER, H. The significance of pathogenic microorganisms in raw milk.- *Staphylococcus aureus*. **International Dairy Federation (IDF)**,p. 24-43, 1995.
- AZEVEDO ACA, et al. Qualidade microbiológica do queijo de manteiga comercializado em supermercados e feiras livres da cidade de Natal, RN. **Higiene Alimentar**. 2017; 31(266/267): 91-95
- BLODGETT, R., 2010. Appendix 2 – Most Probable Number from Serial Dilutions. In: US FOOD AND DRUG ADMINISTRATION (FDA), **Bacteriological Analytical Manual**. Revision February 2006. (Online) Disponível no site: <http://www.fda.gov/Food/FoodScienceResearch/LaboratoryMethods/ucm109656.htm> Acesso em: 13 dez. 2021.
- BORGES, M.F, et al. Microrganismos patogênicos e indicadores em queijo coalho produzido no Estado do Ceará, Brasil. **Boletim do Centro de Pesquisa e Processamento de Alimentos**, v.21, n.1, p.31- 40, 2003.
- BRASIL(a), Ministério da Agricultura e do Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. Departamento de Inspeção de Produtos de Origem Animal. **Regulamentos Técnicos de Identidade e Qualidade de Leite e Produtos Lácteos. Portaria nº 359. Regulamento técnico para fixação de identidade e qualidade do requeijão cremoso ou requesón**. Diário Oficial da República Federativa do Brasil. Brasília DF, 1997.
- BRASIL. Decreto nº 9.918 de 18 de julho de 2019. Regulamenta o art. 10-A da Lei nº 1.283, de 18 de dezembro de 1950, que dispõe sobre o processo de fiscalização de produtos alimentícios de origem animal produzidos de forma artesanal. **Diário Oficial da União**: seção 1, Brasília, DF, n. 138, p. 04, 19 jul. 2019a.

- BRASIL. Lei nº 13.680, de 14 de junho de 2018. Altera a Lei nº 1.283, de 18 de dezembro de 1950, para dispor sobre o processo de fiscalização de produtos alimentícios de origem animal produzidos de forma artesanal. **Diário Oficial da União**, 15 jun. 2018a. Seção 1, n. 114, p. 2. Atos do Poder Legislativo. Disponível em: <https://pesquisa.in.gov.br/imprensa/jsp/visualiza/index.jsp?data=15/06/2018&jornal=515&pagina=2>. Acesso em: 11 dez. 2021.
- BRASIL. Lei nº 13.860, de 18 de julho de 2019. Dispõe sobre a elaboração e a comercialização de queijos artesanais e dá outras providências. **Diário Oficial da União**, 19 jul. 2019b. Seção 1, n. 138, p. 1. Atos do Poder Legislativo. Disponível em: <https://pesquisa.in.gov.br/imprensa/jsp/visualiza/index.jsp?data=15/06/2018&jornal=515&pagina=2>. Acesso em: 11 dez. 2021.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução normativa nº 73, de 23 de dezembro de 2019. **Diário Oficial da União**, 30 dez. 2019c. Seção 1, n. 251, p. 120. Disponível em: <https://pesquisa.in.gov.br/imprensa/jsp/visualiza/index.jsp?data=30/12/2019&jornal=515&pagina=120>. Acesso em: 22 jan. 2021.
- BRASIL. Lei nº 23157, de 18 de dezembro de 2018b. **Dispõe sobre a produção e a comercialização dos queijos artesanais de Minas Gerais**. Disponível em: <https://leisestaduais.com.br/mg/lei-ordinaria-n-23157-2018-minas-gerais-dispoe-sobre-a-producao-e-a-comercializacao-dos-queijos-artesanais-de-minas-gerais>. Acesso em: 14 nov. 2021.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução normativa nº 60, de 23 de dezembro de 2019. **Diário Oficial da União**, 26 dez. 2019c. Seção 1, n. 249, p. 133. Disponível em: <https://www.in.gov.br/en/web/dou/-/instrucao-normativa-n-60-de-23-de-dezembro-de-2019-235332356>. Acesso em: 14 dez. 2021.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 30, de 7 de agosto de 2013. Estabelece critérios adicionais para elaboração de Queijos Artesanais. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**: seção 1, Brasília, DF, n. 152, p. 19, 8 nov. 2013.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Portaria nº 146 de 07 de março de 1996. Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Queijos. **Diário Oficial**, Brasília, 11 março, 1996, p.3977-3978.
- BRASIL, Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde. **Doenças Transmitidas por Alimentos**. Disponível em <<http://portal.arquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2015/novembro/09/Apresenta----o-dados-gerais-DTA-2015.pdf>> Acesso em 22 de Novembro de 2021.
- BRASIL. **O Selo ARTE**. 2020. Disponível em: <https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/producao-animal/selo-arte/selo-arte>. Acesso em: 11 dez. 2021.
- CORREIA, V. T. V, et al. Queijos artesanais: revisão de literatura. **Nutritime Revista Eletrônica**, Viçosa, v. 14, n. 06, p. 8001-8008, dez. 2017.

- D'AOUST, J. Y, et al. *Salmonella* species. In: DOYLE, M. P.; BEUCHAT, L. R. (Ed). **Food Microbiology: Fundamentals and Fontiers**. Washington: ASM Press, 2007.
- EMBRAPA. **Queijos artesanais brasileiros**. 2021. Disponível em: <https://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/infoteca/bitstream/doc/1135036/1/Guia-de-Negocio-Queijos-Artesanais.pdf>. Acesso em: 11 dez. 2021.
- FEITOSA, T. et al. Pesquisa de *Salmonella* sp., *Listeria* sp. e microrganismos indicadores higiênico-sanitários em queijos produzidos no Estado do Rio Grande do Norte. **Ciência Tecnologia de Alimentos**, v.23, p.162- 165, 2003.
- FERNANDES, A. M, et al. (2006). Ocorrência de bactérias patogênicas em queijos no Brasil: questão de Saúde Pública. **Revista Higiene Alimentar**, 20(144), 54-56
- FERNANDES, F. M. **Escherichia coli em queijos produzidos com leite cru**. Coimbra: Politécnico de Coimbra, 2014.
- FERREIRA, R.M., et al. (2011). **Quantificação de coliformes totais e termotolerantes em queijo Minas Frescal artesanal**. PUBVET, Londrina, 5 (5), Ed. 152, Art. 1022. Disponível em: <[http:// www.pubvet.com.br/artigo/1359/quantificaccedilatildeo-de-coliformes-totais-e-termotolerantes-em-queijo-minas-frescal-artesanal](http://www.pubvet.com.br/artigo/1359/quantificaccedilatildeo-de-coliformes-totais-e-termotolerantes-em-queijo-minas-frescal-artesanal)>. Acesso em 13 de dezembro. 2021
- FRANCO, B. D.G. et al. **Microbiologia dos alimentos**. São Paulo: Atheneu, 2013. 182-182 p.
- HENNEKINNE, J. A. et al. *Staphylococcus aureus* and its food poisoning toxins: characterization and outbreak investigation. **FEMS Microbiology Reviews**. v.36, n.4, p.815-836, 2012.
- ICMSF - International Commission on Microbiological Specifications for Foods. *Microrganisms in Foods 5: Microbiological Specifications of Food Pathogens*. London: Blackie Academic and Professional, 1996. 514 p.
- ISO 6888-1. Microbiology of food and animal feeding stuffs – Horizontal method for the enumeration of coagulase-positive staphylococci (*Staphylococcus aureus* and other species) – Part 1: Technique using Baird-Parker agar medium. 1st ed., 1999. Amendment 1:2003. Geneva: **International Organization for Standardization**.
- ISO 6579. Microbiology of food and animal feeding stuffs – Horizontal method for the detection of *Salmonella* spp., 4th ed, 2002. **The International Organization for Standartion**, Amendmente 1: 15/07/2007.
- KAMIMURA, B. A. et al. Enterobacteriaceae, coliforms, and Encheririchia coli as quality and safety indicatoors. In: SALFINGER, Y. & TORTORELLO, M.L. (eds.), Compendium of methods for the Microbiological Examination of Foods, 5th ed. **American Public Health Association**, Washington, D. C., 2015. Chapter 9, p.103-120.

- LEI ESTADUAL/MG n. 14.185, de 31 de janeiro de 2002. **Dispõe sobre o processo de produção do Queijo Minas Artesanal e dá Outras Providências**. Belo Horizonte, 2002.
- LOGUERCIO, A.P. *et al.* Microbiologia de queijo tipo minas frescal produzido artesanalmente. **Ciência Rural**, v.31, p.1063-1067, 2001.
- MENDONÇA, R. C. S. et al. Patógenos na indústria de carnes e derivados. In: Editado [por] Regina Célia Santos Mendonça... [e outros]. **Microbiologia de Alimentos: qualidade e segurança na produção e consumo**. Viçosa-MG: Tribuna Editora Gráfica, p. 21-48, 2003.
- MENESES, J. N. C. **Queijo artesanal de minas: patrimônio cultural do Brasil**. Belo Horizonte: Iphan, 2006. v. 1, 156 p.
- MINAS GERAIS. Decreto nº 48.024, de 19 de agosto de 2020. Regulamenta a Lei nº 23.157, de 18 de dezembro de 2018, que dispõe sobre a produção e a comercialização dos queijos artesanais de Minas Gerais. **Minas Gerais Diário do Executivo**, 20 ago. 2020. Caderno 1, ano 128, n. 171, p. 1. Disponível em: <http://jornal.iof.mg.gov.br/xmlui/handle/123456789/237554>. Acesso em: 11 dez. 2021.
- MINAS GERAIS. Lei nº 23.157, de 18 de dezembro de 2018. Dispõe sobre a produção e a comercialização dos queijos artesanais de Minas Gerais. **Minas Gerais Diário do Executivo**, 19 dez. 2018. Caderno 1, ano 126, n. 234, p. 1. Disponível em: <http://jornal.iof.mg.gov.br/xmlui/handle/123456789/211435>. Acesso em: 12 dez. 2021.
- MINISTÉRIO DA SAÚDE. Governo Federal. **Doenças transmitidas por alimentos: O que são doenças transmitidas por alimentos**. Saúde, [S. l.], p. 1-1, 16 jan. 2020. Disponível em: <https://www.gov.br/saude/pt-br/assuntos/saude-de-a-a-z/d/doencas-transmitidas-por-alimentos#:~:text=A%20Organiza%C3%A7%C3%A3o%20Mundial%20de%20Sa%C3%BAde,anos%2C%20causando%20420%20mil%20mortes>
- PINEDA, A. P. A. et al. Brazilian Artisanal Cheeses: diversity, microbiological safety, and challenges for the sector. **Frontiers In Microbiology**, São Paulo, v. 12, p. 1-16, 20 abr. 2021. Frontiers Media SA.
- SÁNCHEZ-VARGAS, et al. Salmonella infections: An update on epidemiology, management, and prevention. **Travel Medicine and Infectious Disease**, v. 9, n. 6, p. 263-277, 2011.
- SANTANA, R. F., et al. Qualidade microbiológica de queijo-coalho comercializado em aracaju, SE. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, 60(6), 1517–1522. 2008.
- SANTOS NS, et al. Avaliação da qualidade microbiológica de queijos do tipo coalho comercializados em Maceió-AL. **Brazilian Journal of Development**. 2019; 5(7): 9271-9281.

- SEBRAE (2008). **Queijos nacionais: pesquisas de mercado SEBRAE / ESPM 2008**. Disponível em: http://www.bibliotecas.sebrae.com.br/chronus/ARQUIVOS_CHRONUS/bds/bds.nsf/4416AA3881FA433B832574DC00471EF1/%24File/NT0003909A.pdf Acesso em 12 dez de 2021.
- SEIXAS F. N, et al. Pesquisa de staphylococcus coagulase positiva em amostras de queijo artesanal serrano catarinense no município de Lages-SC. **Revista de Educação Continuada em Medicina Veterinária e Zootecnia do CRMV-SP**, v. 11, n. 3, p. 68-69, 11. 2013.
- SILVA F, et al. **Análise microbiológica e físico-química de queijos coloniais com e sem inspeção, comercializados na microrregião de Francisco Beltrão-PR**. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Tecnólogo em Alimentos) - Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Francisco Beltrão, 2013. 58p
- SILVA, L. F. C, et al. Queijo Macururé fabricado em Jacaré dos Homens, AL: características físico-químicas, microbiológicas e de produção. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, [S.l.], v. 75, n. 2, p. 115-125, dez. 2020. ISSN 2238-6416. Disponível em: <<https://rilct.emnuvens.com.br/rilct/article/view/818/532>>. Acesso em: 13 dez. 2021. doi:<https://doi.org/10.14295/2238-6416.v75i2.818>.
- SILVA, L.F. **Procedimento operacional padronizado de higienização como requisito para segurança alimentar em unidade de alimentação**. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Universidade Federal de Santa Maria, RS, 2006.
- SILVA, Neusely et al. **Manual de Métodos de Análise Microbiológica de Alimentos e Água**. 5. ed. São Paulo: Edgard Blucher Ltda, 2018. 535 p.
- SLOW FOOD BRASIL. **Queijos artesanais do Brasil: regiões tradicionais**. 2018. Disponível em: https://slowfoodbrasil.org/wp-content/uploads/2020/10/Mapa-Queijos-Versao_Web_2018_1-scaled.jpg. Acesso em: 11 dez. 2021.
- SOBRAL, D, et al. Requeijão moreno: produto artesanal típico do estado de Minas Gerais. **Informe Agropecuário**. Queijos artesanais mineiros: da matéria-prima ao produto final, Belo Horizonte, v. 34, n. 273, p. 54-59, mar./abr. 2013.
- SOUZA, C. O, et al. Escherichia coli enteropatogênica: uma categoria diarréiogênica versátil. **Revista Pan-Amazônica Saúde**, Ananindeua, v. 7, n. 2, p. 79-91, jun. 2016. Disponível em <http://scielo.iec.gov.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2176-62232016000200079&lng=pt&nrm=iso>. acesso em 11 dez. 2021. <http://dx.doi.org/10.5123/S2176-62232016000200010>.
- TORTORA, et al. **Microbiologia**. 10. ed. Porto Alegre: Artmed, 2012.
- VANETTI, M.C.D. Microrganismos patogênicos em leite. IN: Editado [por] Regina Célia Santos Mendonça...[e outros]. **Microbiologia de Alimentos: qualidade e segurança na produção e consumo**. Viçosa-MG: Tribuna Editora Gráfica, p. 49-56, 2003.