

KARINE ANDREZZA DALMINA

**AVALIAÇÃO DO PERÍODO MÍNIMO DE MATURAÇÃO PARA
COMERCIALIZAÇÃO DO QUEIJO ARTESANAL SERRANO DE SANTA
CATARINA**

Dissertação apresentada ao curso de Pós-Graduação em Ciência Animal, do Centro de Ciências Agroveterinárias da Universidade do Estado de Santa Catarina, como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em Ciência Animal.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Sandra Maria Ferraz.

**LAGES
2018**

Ficha catalográfica elaborada pelo(a) autor(a), com
auxílio do programa de geração automática da
Biblioteca Setorial do CAV/UDESC

Dalmina, Karine Andrezza

Avaliação do período mínimo de maturação para
comercialização do queijo artesanal serrano de Santa
Catarina / Karine Andrezza Dalmina. - Lages , 2018.
67 p.

Orientadora: Sandra Maria Ferraz
Dissertação (Mestrado) - Universidade do Estado de
Santa Catarina, Centro de Ciências
Agroveterinárias, Programa de Pós-Graduação em
Ciência Animal, Lages, 2018.

1. Leite cru. 2. Maturação. 3. Patógenos . 4.
Inocuidade. I. Ferraz, Sandra Maria . II.
Universidade do Estado de Santa Catarina. Programa
de Pós-Graduação. III. Título.

KARINE ANDREZZA DALMINA

**AVALIAÇÃO DO PERÍODO MÍNIMO DE MATURAÇÃO PARA
COMERCIALIZAÇÃO DO QUEIJO ARTESANAL SERRANO DE SANTA
CATARINA**

Dissertação apresentada ao curso de Pós-Graduação em Ciência Animal como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Ciência Animal, da Universidade do Estado de Santa Catarina.

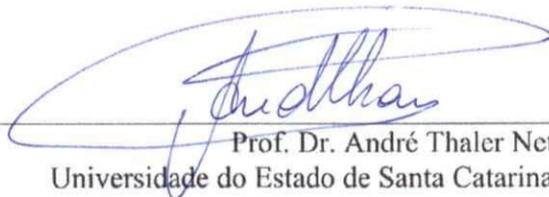
Banca Examinadora:

Orientadora:



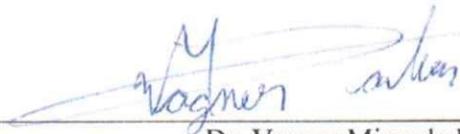
Prof.^a Dr.^a Sandra Maria Ferraz
Universidade do Estado de Santa Catarina - UDESC

Membro:



Prof. Dr. André Thaler Neto
Universidade do Estado de Santa Catarina - UDESC

Membro:



Dr. Vagner Miranda Portes
Empresa de Pesquisa Agropecuária e Extensão Rural de Santa Catarina -
EPAGRI

Lages, 26 de abril de 2018.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a toda equipe do laboratório CEDIMA, por todo apoio, companheirismo e profissionalismo durante todos os anos que tive o prazer de trabalhar nesse local. Sou grata especialmente aos professores que sempre estiveram presentes e dispostos a ajudar sempre que necessário, além de colegas de profissão se tornaram grandes amigos, obrigada professora Sandra Maria Ferraz, Ubirajara Costa e Eliana Vaz, vocês foram essenciais para meu desenvolvimento pessoal e profissional.

À professora Sandra Maria Ferraz, minha orientadora de iniciação científica desde a graduação, e que já considero também uma grande amiga. Já nos conhecíamos antes mesmo de eu sonhar que um dia seria sua aluna, orientada e agora colega de profissão. Grata por todos os ensinamentos, conselhos e oportunidades que me dedicou, tenho certeza foram e serão muito importantes na minha vida. Te admiro muito.

Agradeço também aos meus queridos amigos de pós-graduação, Ricardo Sfaciotte, Leandro Parussolo e Fernanda Melo que foram grandes aliados que me ajudaram muito na execução do projeto, sempre dispostos independente de horário ou cansaço, trabalhando sempre com bom humor tornando a rotina sempre mais leve e divertida, muito obrigada pela amizade construída ao longo desses anos.

Quero fazer também um agradecimento especial a técnica Rosane Legnaghi que foi um braço direito dentro do laboratório, sempre disposta a executar as atividades do projeto de além de toda a rotina de trabalho, se desdobrava e dava conta de fazer um pouco de tudo, obrigada pela dedicação, conselhos e amizade que quero levar sempre comigo. Agradeço também a todos os bolsistas e grandes amigos que tive a oportunidade de conhecer e trabalhar, Isabela Copetti, Marta Leitzke, Giseli Bordignon, Alice Piccolotto, Mateus Schneider, Lucas Telles e todos os estagiários que participaram de alguma forma no projeto.

Gratidão ao meu namorado e amigo Max Raffi que sempre esteve ao meu lado, me incentivando, aconselhando e fazendo acreditar que eu era e sou capaz de conquistar todos os meus sonhos e objetivos. Obrigada, sem você teria sido muito mais difícil.

Obrigada a todos os meus amigos e familiares que estiveram ao meu lado me apoiando e acreditando em mim. Sou muito grata principalmente aos meus pais Lídia Dalmina e Vicente Dalmina e minhas irmãs Michelle Dalmina e Francine Dalmina, eu amo vocês, obrigada por tudo.

À Universidade do Estado de Santa Catarina (UDESC) e ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal (PPGCA) por proporcionar a oportunidade de realizar o mestrado.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de apoio financeiro.

E finalmente a EPAGRI, todos os seus técnicos e extensionistas pelo auxílio durante todo o projeto e também aos produtores que participaram do projeto, muito obrigada pelo fornecimento das amostras e pela confiança depositada no nosso trabalho.

Muito obrigada a todos!

“Eu quero aprender mais, compreender mais, evoluir sempre. Quero ter direito de sonhar alto e alcançar meus objetivos com garra e determinação. Quero conquistar novos conhecimentos, todos os dias. E fazer de cada dia uma lição de vida. Quero desenvolver meus talentos e alcançar meus objetivos, sem deixar de olhar para o mundo ao meu redor. Quero encarar cada desafio como oportunidade. E fazer dos obstáculos minha maior motivação. Eu sei o que eu quero. Eu quero é vencer.”

Joana Darc Sanguinette

RESUMO

O queijo artesanal serrano (QAS) é produzido tradicionalmente na Serra Catarinense por famílias rurais e possui grande importância na rotina dos produtores, principalmente com relação ao desenvolvimento rural sustentável. Na produção, é utilizado leite cru de bovinos, alimento de alto valor nutritivo considerado substrato para multiplicação de micro-organismos, incluindo os patogênicos. A maior preocupação na fabricação do QAS está relacionada justamente com a utilização de leite cru, já que não passa por nenhum tratamento térmico que elimine possíveis patógenos. Visando assegurar um produto livre de perigos microbiológicos, a Portaria nº 146, de 07 de março de 1996 (MAPA), estabelece limites máximos para presença de coliformes totais e *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella* sp. e *Listeria monocytogenes*, em queijos de média umidade. Essas bactérias podem causar surtos alimentares, e nesse contexto, o método que pode contribuir para um produto final seguro, é o processo de maturação, conjunto de fatores físicos, químicos e microbiológicos que desfavorece o desenvolvimento dessas bactérias. A legislação exige um período mínimo de 60 dias de maturação para esse tipo de produto, tempo que contribui para redução de bactérias patogênicas a níveis seguros. Entretanto, existe a possibilidade de reduzir esse período, desde que estudos técnicos-científicos comprovem que não há comprometimento da inocuidade do produto. Essa redução facilita o comércio do produto, já que a maioria dos consumidores prefere queijos menos maturados. O objetivo do trabalho foi avaliar a qualidade microbiológica de QAS em 19 propriedades em processo de regularização, com queijos de 14, 21, 28 e 35 dias de maturação e verificar qual dos períodos estudados estaria de acordo com o padrão estabelecido na legislação. A pesquisa e quantificação de coliformes totais, *E. coli* e *S. aureus*, seguiram protocolos de Silva et al. (2010), utilizando *Petrifilm*TM. A pesquisa de *Salmonella* sp. seguiu a ISO 6579 (2007) e *Listeria monocytogenes*, a Instrução Normativa nº 62, de 26 de agosto de 2003. Os mesmos micro-organismos foram pesquisados no leite, e para avaliação da potabilidade da água foi realizada a técnica do número mais provável (NMP), também seguindo a IN nº 62. Os resultados passaram por teste de Análise de Variância e Regressão Linear do pacote estatístico SAS com significância ($P < 0,05$). Nesse estudo, não foi possível determinar um período de maturação seguro inferior a 60 dias para comercialização. No último período avaliado, aos 35 dias de maturação, 14 propriedades ainda apresentaram quantificações acima do limite para os micro-organismos descritos na legislação. Uma delas, teve presença de *L. monocytogenes* nos 4 períodos avaliados, demonstrando que a maturação não foi suficiente para eliminar o agente e tornando o produto impróprio para consumo. A pesquisa possibilitou a visualização de uma heterogeneidade no processo de produção das queijarias, principalmente nos padrões higiênico-sanitários. E, portanto, antes de pensar na redução do tempo de maturação, são necessárias capacitações em BPA e BPF, apoio das instituições, fiscalização periódica e principalmente comprometimento dos produtores para padronização do processo de fabricação do QAS, para posteriormente realizar novos estudos.

Palavras-chave: Leite cru. Maturação. Patógenos. Inocuidade.

ABSTRACT

The artisanal cheese (AC) is traditionally produced in the ridge of Santa Catarina by rural families and has great importance in the routine of producers, especially in relation to sustainable rural development. In the production, raw milk of cattle is used, food of high nutritional value considered substrate for multiplication of microorganisms, including pathogens. The main concern in the manufacture of AC is related precisely to the use of raw milk, since it doesn't undergo any thermal treatment that eliminates possible pathogens. In order to ensure a product free of microbiological hazards, Ordinance No. 146, dated March 7, 1996 (MAPA), establishes maximum limits for the presence of total coliforms and *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella sp.* and *Listeria monocytogenes*, in medium moisture cheeses. These bacteria can cause food outbreaks, and in this context, the method that can contribute to a safe final product, is the process of maturation, set of physical, chemical and microbiological factors that disadvantage the development of these bacteria. The legislation requires a minimum period of 60 days of maturation for this type of product, a time that contributes to the reduction of pathogenic bacteria to safe levels. However, there is a possibility of reducing this period, provided that technical-scientific studies prove that there is no compromise of product safety. This reduction facilitates trade in the product, since most consumers prefer less matured cheeses. The objective of this work was to evaluate the microbiological quality of AC in 19 regularization properties, with cheeses of 14, 21, 28 and 35 maturation days and to verify which of the studied periods would be in accordance with the standard established in the legislation. The research and quantification of total coliforms, *E. coli* and *S. aureus*, followed protocols of Silva et al. (2010) using Petrifilm™. The *Salmonella sp.* followed by ISO 6579 (2007) and *Listeria monocytogenes*, Normative Instruction No. 62, of August 26, 2003. The same microorganisms were investigated in the milk, and the most probable number technique (NMP) was used to evaluate the water potability, also following IN n° 62. The results were analyzed by Analysis of Variance and Linear Regression of the statistical package SAS with significance ($P < 0.05$). In this study, it was not possible to determine a safe maturation period of less than 60 days for sale. In the last period evaluated, at 35 days of maturation, 14 properties still showed quantifications above the limit for the microorganisms described in the legislation. One of them had *L. monocytogenes* in the four evaluated periods, demonstrating that maturation was not sufficient to eliminate the agent and making the product unfit for consumption. The research made possible the visualization of a heterogeneity in the cheesemaking production process, especially in hygiene and sanitary standards. And, before thinking about the reduction in maturation time, there is a need for training in Good Agricultural Practices and Good Manufacturing Practices, institutional support, periodic inspection and mainly the commitment of the producers to standardize the manufacturing process of AC, to carry out further studies.

Keywords: Raw milk. Maturation. Pathogens. Safety.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Frequência de isolamento e influência do período de maturação sobre a média da quantificação em UFC/g em relação à Coliformes totais, <i>Escherichia coli</i> e <i>Staphylococcus aureus</i>	41
Tabela 2 - Número de amostras fora dos padrões microbiológicos para coliformes totais (acima de 10 ³ UFC/g), <i>Escherichia coli</i> (acima de 5x10 ² UFC/g), <i>Staphylococcus aureus</i> (acima de 10 ³ UFC/g) e média da quantificação em UFC/g.....	45

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	17
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	19
2.1	O QUEIJO ARTESANAL SERRANO EM SANTA CATARINA: CARACTERÍSTICAS E TRAJETÓRIA PARA REGULARIZAR O PRODUTO.....	19
2.2	QUEIJOS PRODUZIDOS A PARTIR DE LEITE CRU.....	21
2.3	HIGIENE DE MANIPULADORES, INSTALAÇÕES E UTENSÍLIOS.....	24
2.4	QUALIDADE DA ÁGUA NA PRODUÇÃO DE QAS.....	26
2.5	MICRO-ORGANISMOS CONTAMINANTES.....	27
2.5.1	Coliformes totais e <i>E.coli</i>.....	27
2.5.2	<i>Staphylococcus aureus</i>.....	28
2.5.3	<i>Listeria monocytogenes</i>.....	29
2.5.4	<i>Salmonella spp</i>.....	30
2.5.5	Aeróbios mesófilos.....	31
2.6	MATURAÇÃO.....	32
3	ARTIGO CIENTÍFICO: AVALIAÇÃO DO PERÍODO MÍNIMO DE MATURAÇÃO PARA COMERCIALIZAÇÃO DO QUEIJO ARTESANAL SERRANO DE SANTA CATARINA.....	35
3.1	RESUMO.....	35
3.2	ABSTRACT.....	36
3.3	INTRODUÇÃO.....	37
3.4	MATERIAIS E MÉTODOS.....	38
3.5	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	41
3.6	CONCLUSÃO.....	53
3.7	REFERÊNCIAS.....	53
4	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	59
	REFERÊNCIAS GERAIS.....	61

1 INTRODUÇÃO

O Queijo Artesanal Serrano (QAS) é um produto típico da Serra Catarinense, e sua produção iniciou a mais de duzentos anos no Sul do país, sendo que até hoje diversas famílias rurais tem essa atividade como uma importante fonte de renda. A principal característica desse produto é a utilização de leite cru em sua formulação, proveniente de bovinos de raças de corte, mistas ou de leite.

Devido ao tipo de matéria-prima utilizada, existe uma preocupação relacionada à segurança microbiológica do QAS, já que o leite por se tratar de um alimento com uma composição muito rica em nutrientes, é considerado um excelente meio de cultura para proliferação de bactérias indesejáveis, e como não passa por nenhum tratamento térmico que possa eliminar possíveis contaminantes, o cuidado higiênico-sanitário, deve ser redobrado.

Alguns dos micro-organismos que podem contaminar o leite e queijo e causar doenças no ser humano incluem *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, coliformes totais, *Salmonella* spp. e *Listeria monocytogenes*, estes devem ser controlados no QAS e, portanto, possuem um limite máximo estabelecido na legislação.

Além do leite, outros pontos podem ser considerados importantes como fontes de contaminação. A qualidade da água utilizada nas propriedades tem grande influência na qualidade microbiológica do leite e do produto final. Portanto, se não forem realizados os tratamentos adequados, a água pode contaminar toda a cadeia produtiva do QAS, já que é amplamente utilizada para higienização desde a sala de ordenha até a queijaria, podendo contaminar o leite, as superfícies, os utensílios e o queijo. Outro ponto importante de contaminação está relacionado aos manipuladores de alimentos, os quais precisam estar com carteira de saúde, curso de Boas Práticas de Fabricação (BPF) e higiene pessoal em dia, evitando ao máximo a transmissão de micro-organismos indesejáveis para a produção.

Diante de tantos pontos que devem ser controlados na produção de QAS, afim de garantir que o produto seja comercializado livre de patógenos, a legislação estabelece que queijos artesanais elaborados a partir de leite cru passem por um processo de maturação de pelo menos 60 dias. Durante esse período, processos químicos, físicos e microbiológicos ocorrem e dificultam a proliferação de bactérias patogênicas, reduzindo sua população ou eliminando-as.

Entretanto, esse período não garante necessariamente um produto final seguro, caso as condições de produção sejam precárias sanitariamente, como relatado em trabalhos anteriores realizados com QAS. Por outro lado, queijos artesanais maturados com um período menor que 60 dias podem também apresentar qualidade e serem considerados seguros para consumo, desde

que a produção seja padronizada e siga todos os critérios higiênico-sanitários impostos na legislação, como já estabelecido por trabalhos técnicos-científicos realizados com alguns tipos de queijos artesanais do Estado de Minas Gerais.

A principal discussão relacionada ao tempo de maturação de queijos artesanais fabricados a partir de leite cru, envolve a necessidade de diminuição desse período devido à preferência dos consumidores por peças mais frescas, macias, com sabor mais leve e também pela melhor logística para os produtores, como retorno financeiro mais rápido, facilidade no transporte e principalmente por possuírem espaço físico limitado para acondicionar tantas peças na sala de maturação.

Diante dessas dificuldades, que atingem não só produtores de QAS mas diversos produtores de queijos artesanais elaborados com leite cru no país, uma nova legislação foi criada, possibilitando a redução desse período, sob a condição da realização de estudos que comprovem que a redução desse período não interfere na qualidade sanitária do produto final. Sendo assim, a Empresa de Pesquisa Agropecuária (EPAGRI) em parceria com o Centro de Ciências Agroveterinárias da Universidade do Estado de Santa Catarina (CAV/UDESC) vem realizando pesquisas com o QAS na tentativa de melhorar as condições de produção e qualidade do produto para que os produtores possam regularizar sua atividade e comercializar o produto de acordo com o gosto do consumidor.

Nesse contexto, o objetivo do trabalho foi avaliar a qualidade microbiológica do QAS em 19 queijarias estruturadas de municípios da Serra Catarinense, em quatro tempos de maturação, com 14, 21, 28 e 35 dias, na tentativa de estabelecer um período menor que o descrito na legislação, seguro para consumo e que facilite a comercialização para os produtores.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 O QUEIJO ARTESANAL SERRANO EM SANTA CATARINA: CARACTERÍSTICAS E TRAJETÓRIA PARA REGULARIZAR O PRODUTO

O Queijo Artesanal Serrano (QAS) tem receita adaptada de origem portuguesa e sua produção no Brasil iniciou há mais de dois séculos com o tropeirismo no Sul do país, nas regiões da Serra Catarinense e Campos de cima da Serra no Rio Grande do Sul. Por sua importância econômica, social e histórica, a produção desse alimento é realizada até hoje demonstrando a relevância que esse produto tem na rotina de diversas famílias, principalmente com relação ao desenvolvimento rural sustentável, já que é uma fonte de renda importante para os produtores e pode representar mais da metade da renda bruta anual das famílias (EPAGRI, 2013).

Tradicionalmente na produção, é utilizado leite cru integral de bovinos alimentados a base de campo nativo, em que 65% da matéria prima é proveniente de raças de corte e seus cruzamentos, 8,5% de raças de corte cruzadas com raças leiteiras e 16,5% são de aptidão leiteira. A maior quantidade de animais de raças de corte ou cruzadas, se deve pelo fato de apresentarem maior rusticidade pois se adaptam melhor ao inverno rigoroso da região (CÓRDOVA et al., 2011).

O leite cru utilizado na fabricação fornece uma característica sensorial singular ao queijo, como sabor e aroma acentuados e característicos e textura levemente amanteigada, aspectos que valorizam o produto e diferenciam de outros (RIES; LUZ; WAGNER, 2012). Segundo Córdova et al., (2011), a fabricação do queijo é realizada na propriedade rural utilizando mão de obra familiar e sua produção é em pequena escala. A receita passou por gerações sem sofrer muitas modificações. No processo de fabricação, o leite cru utilizado passa pela etapa de filtração, coagulação, salga, prensagem da massa e por último o processo de maturação.

O leite é um alimento completo por possuir alto valor nutritivo e por isso é considerado também um excelente meio de cultura para desenvolvimento de micro-organismos, incluindo bactérias patogênicas que podem estar presentes no leite (GERMANO, P., 2011; GERMANO, M., 2011). Além de bactérias que podem estar no leite, Souza (2017) cita que existe a necessidade de controlar todo o processo de fabricação do produto, como condições de higiene durante a fabricação, higiene dos utensílios, equipamentos e manipuladores. Esses aspectos em conjunto determinam a qualidade do produto final.

A principal preocupação na fabricação desse produto artesanal é que o leite utilizado não passa por nenhum tratamento térmico que possa eliminar micro-organismos indesejáveis e conseqüentemente podem contaminar o queijo durante sua produção, reduzindo a qualidade e trazendo riscos para a saúde do consumidor (IDE; BENEDET, 2001).

Dentre os patógenos de maior importância que podem estar contaminando o leite e seus derivados, destacam-se o *Staphylococcus aureus* que pertence ao grupo dos Estafilococos coagulase positivo, *Escherichia coli* do grupo dos coliformes termotolerantes (45°C), *Salmonella* sp. e *Listeria monocytogenes*, esses micro-organismos podem causar doenças transmitidas por alimentos (MELO et al., 2013).

Diante da importância desses agentes para a saúde pública, a Portaria nº 146, de 07 de março de 1996 do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), estabelece limites máximos para esses micro-organismos em diversos alimentos. Para queijos de média a alta umidade, em que se enquadra o QAS, a legislação exige ausência de *Salmonella* sp. e *Listeria monocytogenes* em 25 gramas do alimento. Para *S. aureus* há uma tolerância de até 10^3 UFC/g do alimento, para coliformes a 45°C o limite é 5×10^2 UFC/g, e para coliformes totais a tolerância é de 5×10^3 UFC/g (BRASIL, 1996).

Marcos (1993), comenta que para assegurar a inocuidade desse alimento diante dos micro-organismos em questão, o processo que pode contribuir para a melhoria da qualidade microbiológica do queijo, além da obtenção de uma matéria prima de boa qualidade, é através do processo de maturação. O processo de maturação além de agregar características organolépticas como sabor e aroma também tem função importante na redução de bactérias patogênicas (ORDÓÑEZ et al., 2005). A maturação é a etapa que contempla fatores físicos, químicos e microbiológicos que em conjunto são fundamentais para a estabilidade e inocuidade do queijo, desfavorecendo o desenvolvimento de patógenos (MARCOS, 1993).

Atualmente, o queijo está sendo comercializado com dez a vinte dias de maturação, devido à falta de espaço para armazenamento, facilidade de transporte do produto, retorno financeiro rápido aos produtores e principalmente preferência dos consumidores (CÓRDOVA; SCHLICKMANN; PINTO, 2014). Mas segundo a Instrução Normativa nº 57/2011, queijos artesanais elaborados com leite cru só podem ser comercializados com período inferior a 60 dias de maturação se houverem estudos técnico científicos comprovando que a redução desse período não irá afetar na inocuidade e qualidade do produto final (BRASIL, 2011b).

Apesar da comercialização desse produto estar ocorrendo de maneira irregular, o queijo artesanal serrano é muito valorizado e apreciado pelos consumidores e sua venda é difundida por diversas regiões do estado, além das regiões produtoras. Em virtude disso, desde de 2009 a

Empresa de Pesquisa Agropecuária e Extensão Rural de Santa Catarina (EPAGRI) em conjunto com a Associação Rio-Grandense de Assistência Técnica e Extensão Rural (EMATER) vem trabalhando no Projeto Queijo Artesanal Serrano, com pesquisadores e extensionistas na tentativa de obter uma indicação geográfica, registro e legalização do produto para comercialização. Em Santa Catarina, já foram construídas algumas queijarias, com auxílio do Programa SC Rural. Estas, entraram em processo de regularização da produção de acordo com legislações específicas para que possam obter selo de inspeção junto ao município. No Estado o projeto abrange 18 municípios da Serra catarinense e no Rio Grande do Sul contempla 11 municípios dos Campos de Cima da Serra (CÓRDOVA; SCHLICKMANN; PINTO, 2014).

Com finalidade de regularizar o produto, em 2015 foi elaborado um projeto de lei que dispõe sobre a produção e comercialização do QAS em Santa Catarina, em agosto de 2016 foi aprovado pela Assembleia Legislativa. E por fim, a produção e venda do QAS produzido a partir de leite cru no Estado de Santa Catarina, foi regulamentada pelo Estado de Santa Catarina através do Decreto n° 1.238 de 19 de julho de 2017 publicada no diário oficial do Estado.

Essa decisão muda completamente a trajetória do QAS em Santa Catarina, e a partir de agora, o produtor que atender todas as exigências conseguirá fazer com que seu queijo chegue legalmente a mesa dos consumidores, tendo maior confiabilidade e valor agregado ao seu produto. As queijarias construídas deverão ser certificadas como livre de brucelose e tuberculose, e atender diversos requisitos como processos de fabricação padronizados, instalações adequadas, seguir padrões de higiene de instalações e de manipuladores entre outras exigências descritas no Decreto n° 1.238, e para completar terão fiscalização periódica do órgão sanitário responsável, o sistema de inspeção do município onde é feita a produção do QAS (EPAGRI, 2018).

Tendo em vista a importância social desse produto para diversos municípios da Serra Catarinense, pesquisas constantes visando a qualidade microbiológica são necessárias para avaliar a inocuidade desse alimento artesanal, com objetivo de garantir um produto livre de qualquer tipo de contaminante, e seguro para o consumo.

2.2 QUEIJOS PRODUZIDOS A PARTIR DE LEITE CRU

Existem diversos tipos de queijos no Brasil e no mundo, e na produção, cada variedade pode apresentar alguns processos em comum ou possuir características peculiares de acordo com o produto. Na fabricação de queijos frescos é obrigatória a utilização de leite termicamente

processado. Entretanto, queijos que passam por processo de maturação antes do consumo, tem como opção utilizar o leite cru (CERRI, 2002).

De acordo com a Slow Food Brasil (2012), a principal característica de um produto artesanal, é ser produzido em pequena quantidade e de forma tradicional. Alguns dos queijos mais conhecidos e tradicionais da França como o *brie*, *roquefort* e *camembert* eram produzidos a partir de leite cru. Mas diante da exigente fiscalização desses produtos, afim de atender as legislações sanitárias internacionais, hoje são produzidos com leite pasteurizado e em larga escala industrial. Porém, quando o leite passa por esse processo, ocorre a desnaturação de proteínas, as bactérias lácticas benéficas responsáveis por características específicas do produto são eliminadas e conseqüentemente ocorre alteração de características organolépticas.

Como descrito acima, o leite cru possui uma microbiota própria rica em bactérias ácido lácticas e leveduras, que pode auxiliar no sabor característico do produto devido as enzimas proteolíticas, lipolíticas e glicolíticas que são produzidas pelos micro-organismos, fazendo com que o queijo adquira características sensoriais desejáveis, tais como sabor, aroma e textura (VILJOEN, 2001).

Hoje no Brasil, existem alguns queijos produzidos tradicionalmente a partir de leite cru. Como exemplo, podemos citar alguns produzidos no Estado de Minas Gerais, que são os queijos da Canastra, Serro e Mantiqueira. Já no sul do país, temos o queijo Colonial e Serrano e também temos os queijos nordestinos de Manteiga e Coalho. Alguns produtores ainda não conseguem atender os parâmetros exigidos pela legislação sanitária, mas continuam comercializando seus produtos de maneira irregular (SLOW FOOD BRASIL, 2012), podendo gerar um grave problema de saúde pública pela comercialização de produtos sem procedência.

Como podemos perceber, a utilização de leite cru na fabricação de queijos não traz apenas benefícios. Algumas implicações relacionadas às falhas nas boas práticas de fabricação e agropecuárias, como higiene na ordenha, sanidade dos animais, manipulação inadequada durante a fabricação e armazenamento podem acarretar em problemas de contaminação no produto final, podendo levar a um sério problema de saúde pública (SILVA et al., 2011).

Por se tratar de um alimento rico em nutrientes, o leite é um excelente meio para multiplicação de micro-organismos, incluído bactérias patogênicas. Alguns fatores relacionados nessa contaminação por patógenos envolvem a condição da sanidade do rebanho, relacionadas principalmente a mastite, condição higiênica do exterior do úbere e tetos, higiene de equipamentos de ordenha, utensílios e manipulador (SILVA, 2006).

Por isso existe essa preocupação relacionada ao consumo de queijos fabricados com leite cru, já que esse alimento pode ser uma fonte de transmissão de doenças de origem alimentar (MARQUES et al., 2016).

Para um controle efetivo desses produtos e melhores condições de produção para as famílias rurais, o Decreto n° 1.238 de 19 de julho de 2017 foi criado no Estado de Santa Catarina para um controle do processo de produção como um todo, que vai desde a sanidade do rebanho, até transporte e comercialização do produto (LENZI, 2018).

De acordo com essa legislação, os cuidados relacionados ao leite envolvem disposição de estrutura de curral de espera e sala de ordenha com condições de higiene e bem-estar animal, a sala de ordenha deve possuir, sistema de aquecimento, água em quantidade suficiente e piso impermeável para fácil higienização. O leite deve ser obtido em condições de higiene incluindo o transporte até a queijaria, a utilização desse leite para produção de queijos deve ser em no máximo duas horas após ordenha, entre outras exigências descritas. Todos esses cuidados visam a obtenção de uma matéria prima de qualidade para formulação dos queijos, evitando que durante a fabricação, o processo já inicie com contaminações (SANTA CATARINA, 2018).

Tomando como base a Instrução Normativa N° 7, de 3 de maio de 2016, que aprova o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Leite Cru Refrigerado, alguns testes podem ser realizados para avaliar a qualidade do leite nas propriedades, como contagem padrão em placas (CPP) e contagem de células somáticas (CCS), além de pesquisa de resíduos de antibióticos e análises físico-químicas. Para CPP, o limite máximo recomendado na região sul do país é de 300.000 UFC/mL (BRASIL, 2016).

A contagem padrão em placas é a metodologia mais usada e tida como referência para monitoramento da qualidade microbiológica do leite cru. Essa técnica permite quantificar o número total de bactérias viáveis presentes em 1 mL da amostra analisada (UFC/mL), entretanto ela não consegue identificar quais os gêneros específicos de bactérias que estão presentes. O resultado encontrado nessa análise permite avaliar se estão ocorrendo falhas de higiene durante a obtenção e armazenamento do leite (SANTOS; CORTINHAS, 2010).

Por isso é tão importante ter uma estrutura adequada e com uma pessoa treinada para realizar todo o processo de ordenha da maneira mais higiênica possível, evitando a proliferação de patógenos de interesse em saúde pública, já que o leite obtido será usado cru na fabricação do QAS.

Além dos micro-organismos monitorados pela legislação, esse tipo de alimento pode veicular outras doenças para o ser humano como a brucelose e tuberculose (DINIZ, 2013; FARIA et al., 2014), portanto, é necessário um controle eficiente do rebanho, realizar todos os

exames para obter a certificação como propriedade livre para essas zoonoses (CARVALHO; LINDNER; FARIÑA, 2016) seguindo a legislação.

Levando em consideração o conjunto de fatores que pode resultar em queijos de baixa qualidade, expondo os consumidores à riscos microbiológicos, é fundamental que o produtor esteja comprometido com sua produção respeitando as condições higiênico sanitárias desde a matéria prima, produção, armazenamento e transporte, evitando que o produto fique exposto a contaminação, preservando a saúde dos consumidores e reduzindo os prejuízos econômicos (DANTAS et al., 2013).

2.3 HIGIENE DE MANIPULADORES, INSTALAÇÕES E UTENSÍLIOS

Para obter um alimento seguro para o consumo, além dos cuidados com a qualidade dos ingredientes, é necessário um conjunto de práticas de higiene do local onde esse alimento será processado, dos utensílios utilizados para fabricação e higiene dos manipuladores de alimentos. Esse conjunto de ações é conhecido como Boas Práticas de Fabricação (BPF), que são procedimentos adotados pelas indústrias alimentícias para garantir excelência no processo como um todo e obter um produto de qualidade (BRASIL, 2004).

É muito importante saber quais os pontos mais críticos durante a fabricação de determinado alimento, evitando contaminações e reduzindo as chances de ocorrência de doenças transmitidas por alimentos (DTA's) (MARMETINI et al, 2010).

De acordo com dados do Centro de Controle e Prevenção de Doenças de Atlanta (CDC, Centers for Disease Control and Prevention), grande parte das DTA's está relacionada às falhas na manipulação de alimentos, principalmente com relação aos hábitos higiênicos tanto pessoais, quanto do ambiente de produção (FDA, 2000; NOLLA; CANTOS, 2002).

Córdova et al., (2011) comenta que no processo de produção do queijo artesanal serrano, além dos cuidados com a obtenção da matéria prima, outros pontos de contaminação podem ser considerados importantes e devem ter uma atenção especial. O manipulador, ou seja, quem fabrica o produto, deve ter cuidado redobrado com seus hábitos e higiene pessoal. O uso de roupas limpas e claras, touca para evitar queda de cabelo no alimento, botas de borracha, manter unhas limpas, cortadas e sem esmalte e livrar-se de hábitos como tossir, espirrar, assoar o nariz ou falar em cima do alimento, são práticas que irão colaborar para um produto livre de contaminações microbiológicas.

A higiene das mãos é outro ponto crítico de contaminação, já que o QAS é produzido dentro de um processo totalmente artesanal, e não há como evitar a manipulação direta da massa

e das peças durante a maturação com a viragem dos queijos. Diversos micro-organismos podem também estar presentes nas mãos dos manipuladores, como o grupo de coliformes totais ou *E. coli*, algumas de importância em saúde pública e outras que podem apenas participar do processo de deterioração do alimento. Se as mãos não estiverem devidamente higienizadas antes de iniciar a produção do dia, essa carga microbiana será transferida para o alimento. Segundo Luz et al. (2011) a recomendação é lavar as mãos antes de entrar na sala de processamento, com água e detergente neutro, secar as mãos com papel toalha não reciclado e por último realizar desinfecção com álcool 70%, e repetir esse procedimento sempre que necessário.

De acordo com Tortora, Funke e Case (2000) o *Staphylococcus aureus* é uma bactéria que pode estar presente na mucosa nasal de adultos saudáveis, conhecidos como portadores persistentes e, portanto, pode contaminar as mãos. Outra forma da bactéria estar presente na mão dos manipuladores, é através de infecções cutâneas, por isso é importante que os manipuladores que apresentarem qualquer ferimento nesses locais sejam afastados, deslocados de função ou usem luvas.

A intoxicação por *Staphylococcus aureus* é uma das doenças alimentares mais comuns e ocorre pela ingestão da toxina pré-formada no alimento. Os sintomas clássicos envolvem vômito, diarreia inflamatória com desenvolvimento de enterite (FRANCO; LANDGRAF, 2008).

Além do *S. aureus*, algumas pessoas podem se tornar portadoras assintomáticas para *Salmonella* sp., sendo uma fonte de infecção contínua nos alimentos. Esse agente é causador de infecções gastrointestinais, podendo causar infecções mais graves quando se tratar da espécie *S. typhimurium*, responsável pela febre tifoide no homem, causando septicemia, febre alta, diarreia e vômito, podendo levar a óbito (SHINOHARA et al., 2008).

Por esse e outros motivos relacionados a saúde do manipulador, é necessário que as pessoas envolvidas em atividades do ramo alimentício, possuam carteira de saúde, realizem os exames médicos periodicamente, comprovando que estão aptas a desenvolver suas atividades sem causar riscos a inocuidade do alimento (LONG, 2016).

Além de todos esses cuidados com higiene de instalações e saúde dos colaboradores, uma atenção especial deve ser dada também aos pequenos utensílios utilizados na fabricação, principalmente os que irão entrar em contato direto com o leite ou massa do QAS.

Córdova et al., (2011) cita todo o fluxograma básico de produção, e nele, podemos destacar os seguintes processos: filtragem do leite, realizada para retirar impurezas através de dessoradores (filtro com peneira ou tecido fino); corte da coalhada realizada geralmente com lira de alumínio; dessoragem, com pressão manual sobre a massa ou dessorador; enformagem,

a massa é colocada em uma forma com pequenos furos forrada por tecido fino para retirar o restante do soro; prensagem, inicialmente é de forma manual e depois mecânica; toailete, corte de sobras da massa; cura, algumas propriedades realizam lavagem (água quente ou soro do dia) e viragem dos queijos em prateleiras de madeira de araucária.

Todas essas etapas envolvem alguns utensílios que se não forem bem higienizados, podem ser fontes de contaminação. Os tecidos, lira, formas, facas o soro utilizado para lavagem e a tábua de maturação, também são pontos que requerem uma atenção especial. Segundo as orientações de Luz et al. (2011), para sanitização desses materiais, a recomendação é de que fiquem imersos em solução à base de cloro. As tábuas de maturação também devem ser lavadas com certa frequência, principalmente por serem de madeira, recomenda-se realizar a cada 15 ou 20 dias a lavagem das tábuas que estão com queijos mais frescos e a cada 30 dias as que estão com queijos mais maturados.

Para um melhor controle desses processos, as queijarias devem possuir registros de todas as atividades desenvolvidas dentro do estabelecimento. Os registros podem ser realizados através de planilhas de autocontrole de fácil preenchimento. Todo esse conjunto de cuidados, será fundamental na obtenção de um queijo de qualidade e inócuo, respeitando todos os parâmetros dispostos na legislação (SANTA CATARINA, 2018)

2.4 QUALIDADE DA ÁGUA NA PRODUÇÃO DE QAS

Em indústrias de laticínios, a água é um item essencial para procedimentos de limpeza e sanitização, higiene pessoal e em operações de processamento no geral, e por isso deve haver um monitoramento constante para garantir sua qualidade, já que pode ser fonte de contaminação para os alimentos (KAMIYAMA; OTENIO, 2013).

A má qualidade da água utilizada nas propriedades tem influência direta na contaminação do leite durante a ordenha, dos utensílios e do queijo em sua fabricação e maturação. Portanto, o padrão de potabilidade da água utilizada para todos os procedimentos relacionados a produção de QAS, deve ser o mesmo padrão estabelecido para consumo direto. Em vista disso, a maioria das propriedades produtoras de QAS possui abastecimento de fontes protegidas, realiza tratamento com cloro, higienização e desinfecção da caixa d'água periodicamente (CÓRDOVA et al., 2011).

O tratamento com cloro tem como objetivo eliminar contaminações para reduzir os riscos à saúde pública. O padrão de potabilidade de água para consumo no Brasil é ausência de coliformes totais e *E. coli* em 100 mL da amostra analisada. Os coliformes totais são

considerados indicadores da eficiência do tratamento realizado e *E. coli* é um indicador de contaminação fecal (BRASIL, 2011a). Em vista disso, é necessário um monitoramento periódico da qualidade da água desses estabelecimentos através de análises semestrais, atestando que a água está livre de contaminações e pode ser utilizada sem preocupação (LUZ et al., 2011).

2.5 MICRO-ORGANISMOS CONTAMINANTES

2.5.1 Coliformes totais e *E.coli*

Segundo Silva et al. (2011), os coliformes totais e termotolerantes são as bactérias que possuem maior potencial para se desenvolver em queijos. Os coliformes totais são bastonetes Gram-negativos pertencentes à família *Enterobacteriaceae*. A principal característica dessas bactérias é a capacidade de fermentar lactose com produção de gás em 24 a 48 horas e temperatura de 35°C. Dentro dessa particularidade entram aproximadamente 20 espécies que podem ter origem entérica (*E. coli*), provenientes de humanos ou animais de sangue quente, quanto bactérias que podem ser de origem não entérica, como no caso dos gêneros *Citrobacter*, *Serratia*, *Klebsiella* e *Enterobacter*, além de outras, que podem estar presentes em vegetais e solo (SILVA et al. 2010). Com isso, a detecção de coliformes totais nos alimentos não indica necessariamente uma contaminação fecal (FRANCO; LANDGRAF, 2008).

Já coliformes termotolerantes, é um subgrupo dos coliformes totais em que possuem capacidade de fermentar lactose em 24 horas a 44,5- 45,5°C. Ainda existe o hábito de chamar esse grupo de coliformes fecais, entretanto, hoje já é conhecido que cerca de 90% do grupo é constituído por cepas de *E. coli*, obrigatoriamente de origem fecal, porém o restante do grupo pode conter cepas de origem não fecal que possuem a mesma característica, como *Klebsiella pneumoniae*, *Citrobacter freundii* e *Enterobacter aerogenes*, por exemplo. Por esse motivo a nomenclatura foi substituída por coliformes termotolerantes (CARDOSO et al., 2001).

Esses micro-organismos podem ser utilizados como indicadores das condições de higiene do processo de fabricação de alimentos, como no caso de enterobactérias e coliformes, pois quando presentes, mostram que existem falhas relacionadas as condições de higiene no processo de fabricação, já que são facilmente inativados por sanitizantes. Já *E. coli*, sinaliza que houve contaminação de origem fecal em alimentos não processados (SILVA et al., 2010).

Segundo Martins (2006), um dos principais defeitos causados em queijos contaminados por esse grupo de bactérias, é o estufamento precoce. Queijos com muitas olhaduras irregulares na massa demonstram a característica típica desse problema.

Enquanto os coliformes totais atuam mais como indicadores das condições de higiene do processo, a presença de *E. coli* chama atenção para um grave problema de saúde pública. De acordo com Leite e Franco (2006), várias linhagens de *E. coli* são patogênicas ao ser humano, causando graves infecções e muitas vezes levando o paciente à óbito. A classificação das cepas ocorre com base na atuação que cada uma tem no hospedeiro, e são separadas em *E. coli* enteropatogênica clássica (EPEC), enterotoxigênica (ETEC), entero-invasora (EIEC), enterohemorrágica (EHEC) e entero-agregativa (EAEC).

Dentre essas, a cepa enterohemorrágica (EHEC) está amplamente associada a doenças transmitidas por alimentos, sobretudo ao consumo de carne moída malcozida e leite cru. Essa variedade tem como sorotipo de maior relevância a *E. coli* O157:H7, produzindo toxinas do tipo shiga-like (stx1 e stx2) desencadeando episódios de diarreia em conjunto com colite hemorrágica e síndrome urêmica hemolítica (HUS), podendo levar ao óbito. Pela relevância que esse patógeno possui em saúde pública, sua presença em alimentos gera preocupação e evidencia a importância de um monitoramento e controle eficaz para que os alimentos não entrem em contato com esses micro-organismos, principalmente os alimentos consumidos “in natura”.

Em trabalhos realizados com QAS, Melo et al. (2013) e Pontarolo (2014) encontraram um percentual de amostras com quantificações acima do limite imposto na legislação de 34,26% para coliformes totais (CT), 36,11% para *E. coli* (EC) e 69,35% (CT), 46,77% (EC), respectivamente. Resultados que indicam condições insatisfatórias de higiene na produção do QAS.

2.5.2 *Staphylococcus aureus*

O gênero *Staphylococcus* pertence a família *Micrococcaceae*, são bactérias aeróbias facultativas, Gram-positivas imóveis com morfologia de cocos, produtoras de catalase e pertencem ao grupo dos *Staphylococcus* coagulase positivos. Dentre as espécies desse grupo, o *S. aureus* é a espécie mais virulenta, capaz de causar várias doenças sistêmicas, além de ser o principal causador de doenças de origem alimentar, comumente associado a intoxicações alimentares (MURRAY; ROSENTHAL; PFALLER, 2014).

Os principais reservatórios de *S. aureus* são os animais e o homem, sendo que aproximadamente 50% dos adultos saudáveis podem ser portadores persistentes desse micro-organismo na cavidade nasal, e a partir desse ponto pode infectar a pele, cabelo, feridas ou qualquer superfície ou alimento que entre em contato com a pessoa infectada. Diante disso, pessoas portadoras que manipulam alimentos disseminam o agente para o alimento, que se torna uma fonte de intoxicação alimentar (MACEDO, 2016).

Além dessa rota de transmissão para o alimento, esse agente também está amplamente associado à mastite bovina. Portanto, a contaminação por essa bactéria no leite pode ser proveniente de um processo infeccioso na glândula mamária do animal e posteriormente transferido para os derivados lácteos. O *S. aureus* é facilmente eliminado pelo calor e é destruído com facilidade no processo de pasteurização (SILVA et al., 2010), mas no caso do QAS, o leite não passa por nenhum tratamento térmico que possa garantir a ausência desse patógeno no produto final.

Portanto, a contaminação de queijos artesanais se origina principalmente através de leite de baixa qualidade, transmissão por portadores assintomáticos e também por utensílios que não foram higienizados corretamente (BORGES et al., 2008).

Conforme Silva et al. (2010), a formação de toxinas no alimento ocorre pela multiplicação do *S. aureus*, e para que consiga causar a intoxicação, a quantidade necessária da bactéria em 1g do alimento é de 10^6 UFC. A sintomatologia inicia em 2 a 6 horas após ingestão causando náusea, vômito, cólica, hipotermia e prostração.

Melo (2013), obteve uma taxa de não conformidade para *S. aureus* de 33,33% nas amostras de QAS analisadas, já Pontarolo (2014) obteve 53,22% das amostras de QAS com valores acima do limite estipulado na legislação, (10^3 UFC/g).

2.5.3 *Listeria monocytogenes*

De acordo com Silva e colaboradores (2010), cepas de *L. monocytogenes* são bastonetes pequenos, Gram-positivos, não formam esporos, possuem a enzima catalase e não produzem H_2S . Esses micro-organismos podem crescer numa faixa de temperatura que varia de 1 a 45°C, consideradas psicrótróficas pois conseguem se multiplicar em temperaturas de refrigeração, e sua temperatura ótima de crescimento é entre 30-37°C. Está amplamente distribuída no ambiente, principalmente no solo, água, esgoto, silagem e fezes.

O queijo de alta e média umidade, dentre os derivados lácteos, é o alimento que mais está associado a surtos causados por *L. monocytogenes*. A maior preocupação é a forma de

armazenamento e consumo desse produto pois mesmo em refrigeração pode resistir e até se desenvolver no alimento, e por se tratar de um alimento pronto para o consumo que não passará por tratamento térmico que possa eliminar o agente (BARANCELLI, 2011).

Essa bactéria é potencialmente patogênica para o homem e é responsável por causar a listeriose, que pode iniciar com sintomas leves semelhantes a gripe podendo progredir para quadros de septicemia, encefalite, meningite e infecções intrauterinas que podem levar ao aborto em mulheres, e em casos mais graves, morte (SILVA et al., 2010).

Os indivíduos mais suscetíveis a infecção são pessoas com imunidade debilitada como crianças, idosos, gestantes, pacientes que realizam hemodiálise e terapias prolongadas com corticoides (BORGES et al., 2009).

Considerando a capacidade que esse patógeno possui de sobreviver em condições inóspitas para grande parte dos patógenos, como resistir a baixa atividade de água, baixas temperaturas, faixas de pH extremas, e altas concentrações de sal, essa bactéria chama atenção para redobrar os cuidados em indústrias alimentícias (ZUNABOVIC et al., 2011).

Apesar de conseguir sobreviver e até se multiplicar em condições adversas, a *L. monocytogenes* é facilmente inativada pelo calor, não sobrevivendo a processos de pasteurização. Contudo, tem capacidade de formar biofilme em superfícies que entram em contato com o alimento na indústria, podendo ocasionar contaminação cruzada de produtos que já foram processados (VÄLIMAA et al., 2015).

Levando em consideração a gravidade da presença desse patógeno em alimentos, a legislação brasileira estipula ausência desse micro-organismo em 25 gramas do produto (BRASIL, 1996). Em estudo realizado com o QAS de Santa Catarina, Melo (2013) isolou *L. monocytogenes* em três (2,77%) amostras analisadas tornando os produtos impróprios para consumo. Mesmo sendo um percentual baixo, é um alerta para a presença desse patógeno nas plantas de processamento de QAS.

2.5.4 *Salmonella* spp.

São bacilos Gram-negativos, pertencem a família *Enterobacteriaceae*, tem capacidade de formar ácido, a grande maioria é móvel, produzem gás a partir da glicose. Grande parte das salmonelas de interesse clínico não consegue fermentar lactose, indol e oxidase negativa, sua temperatura ótima de crescimento é 37°C, mas suporta uma faixa entre 7-43°C e pH entre 3,8 - 9,5 suportando melhor pH de 7, e atividade de água 0,94 (BRASIL, 2011d).

As espécies mais relacionadas por causar doença no ser humano são do grupo da *Salmonella enterica* subespécie *enterica*, correspondendo a 99% das infecções por *Salmonella* no homem, e seu habitat principal é o trato intestinal de humanos e animais. Sua classificação baseia-se nas estruturas superficiais antigênicas, antígeno somático (O), capsular (Vi) e flagelar (H) (SILVA et al., 2010).

Salmonella spp. está associada a doenças diarreicas e é considerada um dos principais agentes de casos fatais, devido as complicações que causa nos pacientes (MENDONÇA; VIEIRA; OLIVEIRA, 2003). As síndromes causadas por esse micro-organismo no homem envolvem quadros de gastroenterite, febre entérica, septicemia ou sem infecções localizadas, caracterizando portadores assintomáticos (BRASIL, 2011d).

A infecção no homem geralmente ocorre pela ingestão de produtos de origem animal contaminados (SILVA et al., 2010), em que alimentos com elevado teor de proteína e água estão constantemente associados a surtos, destacando produtos lácteos, carnes e derivados (GERMANO, P.; GERMANO, M., 2010). Deste modo, a presença desse agente em alimentos deve ser controlada, razão pelo qual a legislação preconiza ausência nos queijos (BRASIL, 1996).

2.5.5 Aeróbios mesófilos

A contagem de aeróbios mesófilos pode ser chamada também de Contagem padrão em placas (CPP), essa técnica é amplamente utilizada como um indicador geral da população bacteriana presente em um determinado alimento. Esse método não deve ser usado como indicador da segurança do produto, já que não identifica quais as bactérias presentes, porém auxilia na obtenção de informações relacionadas a qualidade do alimento, uma vez que altas contagens podem indicar falhas de higiene no processo de obtenção do produto (SILVA et al., 2010).

Existem algumas legislações internacionais que determinam limites para presença desses micro-organismos em alguns alimentos (SILVA et al., 2010), entretanto, no Brasil ainda não há legislação específica estabelecendo parâmetros para aeróbios mesófilos em queijos fabricados a partir de leite cru.

De acordo com a Instrução Normativa nº 7 de 29 de maio de 2016 (MAPA), a CPP é método padrão para avaliar a qualidade microbiológica do leite cru, que estabelece como limite máximo de 3×10^5 UFC/mL, incluindo a região sul do país (BRASIL, 2016). Portanto, o controle da qualidade do leite e condições de higiene durante o processamento são essenciais

para reduzir a população de aeróbios mesófilos, melhorando a qualidade higiênico sanitária e consequentemente vida de prateleira do queijo produzido (PICOLI et al., 2006).

2.6 MATURAÇÃO

A maturação é responsável por diversas modificações físico-químicas e microbiológicas no interior da massa do queijo (MARTINS, 2006). Algumas reações contribuem para o desenvolvimento da textura e sabor dos queijos, como a glicólise, proteólise e lipólise (NARIMATSU et al., 2003). Queijos fabricados a partir de leite cru, possuem uma microbiota autóctone dominante durante a cura. São as bactérias ácido lácticas dos gêneros *Enterococcus*, *Lactococcus* e *Lactobacillus*. Esses, atuam no desenvolvimento do aroma característicos do queijo durante a maturação, mas além desse atributo, atuam como uma importante barreira à multiplicação de bactérias indesejáveis através da competição (DAHL et al., 2000).

Durante a cura, a lactose residual do queijo é transformada em ácido láctico pela microbiota autóctone levando a uma acidificação do meio (TENREIRO, 2014). Além disso com o passar dos dias o queijo começa a perder umidade, reduzindo a atividade de água (a_w) e consequentemente levando a um aumento na concentração do sal, fatores que colaboram para redução ou eliminação de possíveis patógenos (ORDÓÑEZ et al., 2005). Além disso, a temperatura e umidade durante armazenagem, também influenciam a atividade de água, portanto devem ser monitoradas visando controlar o crescimento bacteriano (DORES et al, 2012).

No início da maturação, quando o pH ainda está elevado, bactérias do grupo dos coliformes competem com a bactérias ácido lácticas, podendo aumentar sua população inicial, ocasionando problemas de estufamento precoce nos queijos, devido ao gás que produzem quando sua quantificação é muito elevada. Entretanto, quando as condições ficam desfavoráveis no meio, essas bactérias começam a reduzir sua população, podendo até desaparecer. Presume-se que o mesmo ocorra com os demais micro-organismos indesejáveis presentes no queijo, já que a maior parte deles é sensível a acidez e baixa atividade de água (ORDÓÑEZ et al., 2005).

Diante dos perigos microbiológicos que podem existir envolvendo o consumo de queijos produzidos a partir de leite cru, o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Queijos (RTIQ) da Portaria N° 146/1996 do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), permitia que queijos produzidos a partir de leite cru fossem comercializados após passar por período de maturação de 60 dias (BRASIL, 1996).

Entretanto, esse período de 60 dias não garante necessariamente a inocuidade do produto, pois como visto em estudos anteriores, amostras de QAS com 63 dias, ainda apresentavam contagens de patógenos acima da legislação (MELO, 2013), demonstrando que nem mesmo a maturação foi capaz de solucionar problemas de contaminações devido a um processo de produção com baixa qualidade higiênico sanitária. O contrário também pode se aplicar, quando se fala em reduzir o período de maturação, se o processo seguir as boas práticas de fabricação, preceitos de higiene e a contaminação inicial não for alta, um período menor que o descrito na lei pode ser suficiente para adequar a carga bacteriana indesejável do queijo ao limite imposto na legislação, assim como ocorreu nos estudos realizados por Martins (2006) e Dores (2007), que foram cruciais para estabelecer tempos de maturação reduzidos em queijo Minas artesanal.

Portanto, uma maturação de 60 dias, além de não ser necessária em alguns casos, pode se tornar um processo dispendioso pela necessidade de instalações específicas (salas de maturação) com capacidade suficiente para esse tempo de cura, maior disponibilidade de capital de giro e despesas de manutenção. Devido a isso muitos produtores não respeitam o período estipulado e vendem seus produtos antes do tempo adequado de cura (PERRY, 2004).

Hoje, o QAS é comercializado com maturação que varia de dez a vinte dias. Isso ocorre pela necessidade que o produtor tem de vender seu produto de acordo com o gosto do consumidor, que prefere um produto mais macio e também por fatores como a indisponibilidade de espaço das salas de maturação para acomodar tantas peças, assim como um retorno financeiro mais rápido (CÓRDOVA; SCHLICKMANN; PINTO, 2014). Devido ao forte apelo comercial e tradicional que esses produtos artesanais têm, e por diversas famílias dependerem dessa fonte de renda, a necessidade de reduzir o período de maturação com intuito de melhorar as condições de produção é essencial, sempre alertando para que essa redução não comprometa características nutricionais, sensoriais e qualidade microbiológica do produto (PERRY, 2004).

Perante o exposto, a Instrução Normativa nº 57 de 15 de dezembro de 2011 (MAPA), passou a permitir que queijos elaborados a partir de leite cru podem passar por um processo de maturação inferior a 60 dias, na condição de que estudos científicos comprovem que essa redução não afeta a qualidade sanitária do produto (BRASIL, 2011b).

Alguns queijos artesanais de Minas Gerais já são comercializados com maturação reduzida. De acordo com a Portaria Nº 1305/2013 do Instituto Mineiro de Agropecuária (IMA), ficou estabelecido um período de 17 dias para queijo Minas artesanal do Serro e 22 dias para regiões do Cerrado, Canastra, Campo das Vertentes e Araxá. Não há possibilidade de

comercializar com menos tempo, esses períodos serão mantidos até que novos estudos sejam realizados, seguindo a legislação (MINAS GERAIS, 2013).

Nesse sentido, produtores de QAS de Santa Catarina esperam que também possam comercializar seus produtos com um menor período de maturação de forma regular, seguindo a ideia de Machado et al. (2004), de que estudos sejam realizados para cada variedade de queijo e determinem a maturação específica de cada região e produto, colocando em primeiro lugar a integridade do consumidor, mas também atendendo às necessidades comerciais dos produtores.

3 ARTIGO CIENTÍFICO: AVALIAÇÃO DO PERÍDO MÍNIMO DE MATURAÇÃO PARA COMERCIALIZAÇÃO DO QUEIJO ARTESANAL SERRANO DE SANTA CATARINA

3.1 RESUMO

O queijo artesanal serrano (QAS) é produzido tradicionalmente na Serra Catarinense por famílias rurais e possui grande importância na rotina dos produtores, principalmente com relação ao desenvolvimento rural sustentável. Na produção, é utilizado leite cru de bovinos, alimento de alto valor nutritivo considerado substrato para multiplicação de micro-organismos, incluindo os patogênicos. A maior preocupação na fabricação do QAS está relacionada justamente com a utilização de leite cru, já que não passa por nenhum tratamento térmico que elimine possíveis patógenos. Visando assegurar um produto livre de perigos microbiológicos, a Portaria nº 146, de 07 de março de 1996 (MAPA), estabelece limites máximos para presença de coliformes totais e *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella* sp. e *Listeria monocytogenes*, em queijos de média umidade. Essas bactérias podem causar surtos alimentares, e, nesse contexto, o método que pode contribuir para um produto final seguro, é o processo de maturação, conjunto de fatores físicos, químicos e microbiológicos que desfavorece o desenvolvimento dessas bactérias. A legislação exige um período mínimo de 60 dias de maturação para esse tipo de produto, tempo que contribui para redução de bactérias patogênicas a níveis seguros. Entretanto, existe a possibilidade de reduzir esse período, desde que estudos técnicos-científicos comprovem que não há comprometimento da inocuidade do produto. Essa redução facilita o comércio do produto, já que a maioria dos consumidores prefere queijos menos maturados. O objetivo do trabalho foi avaliar a qualidade microbiológica de QAS em 19 propriedades em processo de regularização, com queijos de 14, 21, 28 e 35 dias de maturação e verificar qual dos períodos estudados estaria de acordo com o padrão estabelecido na legislação. A pesquisa e quantificação de coliformes totais, *E. coli* e *S. aureus*, seguiram protocolos de Silva et al. (2010), utilizando *Petrifilm*TM. A pesquisa de *Salmonella* sp. seguiu a ISO 6579 (2007) e *Listeria monocytogenes*, a Instrução Normativa nº 62, de 26 de agosto de 2003. Os mesmos micro-organismos foram pesquisados no leite, e para avaliação da potabilidade da água foi realizada a técnica do número mais provável (NMP), também seguindo a IN nº 62. Os resultados passaram por teste de Análise de Variância e Regressão Linear do pacote estatístico SAS com significância ($P < 0,05$). Nesse estudo, não foi possível determinar um período de maturação seguro inferior a 60 dias para comercialização. No último período avaliado, aos 35 dias de maturação, 14 propriedades ainda apresentaram quantificações acima do limite para os micro-organismos descritos na legislação. Uma delas, teve presença de *L. monocytogenes* nos 4 períodos avaliados, demonstrando que a maturação não foi suficiente para eliminar o agente e tornando o produto impróprio para consumo. A pesquisa possibilitou a visualização de uma heterogeneidade no processo de produção das queijarias, principalmente nos padrões higiênico-sanitários. E, portanto, antes de pensar na redução do tempo de maturação, são necessárias capacitações em BPA e BPF, apoio das instituições, fiscalização periódica e principalmente comprometimento dos produtores para padronização do processo de fabricação do QAS, para posteriormente realizar novos estudos.

Palavras-chave: Leite cru. Maturação. Patógenos. Inocuidade.

3.2 ABSTRACT

EVALUATION OF THE MINIMUM MATURATION PERIOD FOR COMMERCIALIZATION OF SERRANO ARTISANAL CHEESE FROM SANTA CATARINA.

The serrano artisanal cheese (SAC) is traditionally produced in the ridge of Santa Catarina by rural families and has great importance in the routine of producers, especially in relation to sustainable rural development. In the production, raw milk of cattle is used, food of high nutritional value considered substrate for multiplication of microorganisms, including pathogens. The main concern in the manufacture of SAC is related precisely to the use of raw milk, since it doesn't undergo any thermal treatment that eliminates possible pathogens. In order to ensure a product free of microbiological hazards, Ordinance No. 146, dated March 7, 1996 (MAPA), establishes maximum limits for the presence of total coliforms and *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella sp.* and *Listeria monocytogenes*, in medium moisture cheeses. These bacteria can cause food outbreaks, and in this context, the method that can contribute to a safe final product, is the process of maturation, set of physical, chemical and microbiological factors that disadvantage the development of these bacteria. The legislation requires a minimum period of 60 days of maturation for this type of product, a time that contributes to the reduction of pathogenic bacteria to safe levels. However, there is a possibility of reducing this period, provided that technical-scientific studies prove that there is no compromise of product safety. This reduction facilitates trade in the product, since most consumers prefer less matured cheeses. The objective of this work was to evaluate the microbiological quality of SAC in 19 regularization properties, with cheeses of 14, 21, 28 and 35 maturation days and to verify which of the studied periods would be in accordance with the standard established in the legislation. The research and quantification of total coliforms, *E. coli* and *S. aureus*, followed protocols of Silva et al. (2010) using Petrifilm™. The *Salmonella sp.* followed by ISO 6579 (2007) and *Listeria monocytogenes*, Normative Instruction No. 62, of August 26, 2003. The same microorganisms were investigated in the milk, and the most probable number technique (NMP) was used to evaluate the water potability, also following IN n° 62. The results were analyzed by Analysis of Variance and Linear Regression of the statistical package SAS with significance ($P < 0.05$). In this study, it was not possible to determine a safe maturation period of less than 60 days for sale. In the last period evaluated, at 35 days of maturation, 14 properties still showed quantifications above the limit for the microorganisms described in the legislation. One of them had *L. monocytogenes* in the four evaluated periods, demonstrating that maturation was not sufficient to eliminate the agent and making the product unfit for consumption. The research made possible the visualization of a heterogeneity in the cheesemaking production process, especially in hygiene and sanitary standards. And, before thinking about the reduction in maturation time, there is a need for training in Good Agricultural Practices and Good Manufacturing Practices, institutional support, periodic inspection and mainly the commitment of the producers to standardize the manufacturing process of SAC, to carry out further studies.

Keywords: Raw milk. Maturation. Pathogens. Safety.

3.3 INTRODUÇÃO

O Queijo Artesanal Serrano (QAS) de Santa Catarina é amplamente produzido por diversas famílias rurais que buscam nessa atividade uma fonte de renda extra, ou que muitas vezes auxilia em mais da metade de rendimento bruto desses produtores, demonstrando uma importância social e econômica (EPAGRI, 2013).

As suas principais características de produção são a utilização de leite cru integral de bovinos na sua formulação e ampla manipulação, por ser produzido artesanalmente (CÓRDOVA et al., 2011). O leite pode ser considerado um excelente meio de cultura para micro-organismos, incluindo os patogênicos, pois possui características como elevada atividade de água (a_w), pH próximo a neutralidade e um alto valor nutritivo devido aos seus componentes (GERMANO, P.; GERMANO, M., 2010), e como não passa por processo de pasteurização pode se tornar uma fonte de contaminação para o QAS.

A produção do QAS inicia logo após a ordenha e como ingredientes são utilizados apenas sal e coalho. As etapas de fabricação envolvem filtração do leite, adição de coalho, coagulação, corte da coalhada, mexedura, dessoragem, salga, enformagem, prensagem e maturação (SEAPA, 2010).

Dessas etapas, a maturação atua como importante processo que visa garantir a inocuidade do produto final. De acordo com Sales (2015), nessa etapa ocorre redução de umidade, queda de pH e aumento da concentração de cloreto de sódio (NaCl), fatores que favorecem a eliminação de bactérias indesejáveis e contribuem para a permanência de micro-organismos desejáveis, como as bactérias ácido lácticas, responsáveis por características singulares do queijo como cor, textura e sabor acentuado.

Portanto, a maturação é um processo necessário para assegurar um QAS de qualidade que não ofereça riscos à saúde do consumidor. De acordo com a Portaria nº 146, de 7 de março de 1996 do MAPA, queijos produzidos a partir de leite cru devem passar por processo de maturação de no mínimo 60 dias, para garantir a inocuidade do alimento.

Contudo, esse período dificilmente é respeitado pelos produtores, pois os mesmos relatam que a preferência dos consumidores é por peças de QAS com 10 a 20 dias de maturação, com isso a rotatividade do produto é maior otimizando espaço dentro das salas de maturação, que em sua grande maioria são pequenas, e principalmente tendo um retorno financeiro mais rápido (CÓRDOVA; SCHLICKMANN; PINTO, 2014).

Levando em consideração essas questões que envolvem produtores de queijos artesanais de todo o país, a Instrução Normativa nº 57/2011 do MAPA abriu a possibilidade da

comercialização de queijos artesanais produzidos a partir de leite cru com período inferior a 60 dias, desde que a inocuidade do produto seja comprovada por estudos técnico-científicos (BRASIL, 2011a).

Hoje no Brasil, alguns queijos já conseguiram essa comprovação e fixação de períodos reduzidos de maturação, como ocorre no Estado de Minas Gerais com o queijo da Canastra por exemplo, comercializado legalmente com 21 dias de maturação (PASSIL, 2015). E é nessa expectativa de melhoria da qualidade do QAS que a associação de produtores e a EPAGRI/SC trabalham em conjunto com objetivo de facilitar a comercialização desse produto atendendo as necessidades dos produtores e consumidores, sempre respeitando as legislações para poder chegar no patamar de qualidade que outros queijos artesanais produzidos no país alcançaram.

Perante a essas questões, o presente trabalho teve como objetivo avaliar amostras de QAS em quatro diferentes períodos de maturação, em queijarias em processo de legalização e após um treinamento básico sobre práticas de higiene durante a produção com os produtores, além disso avaliar a qualidade microbiológica da água e leite utilizados na fabricação do QAS.

3.4 MATERIAIS E MÉTODOS

O estudo foi desenvolvido em 19 queijarias localizadas em propriedades rurais da região serrana de Santa Catarina, compreendendo os municípios de São Joaquim, Bom Jardim da Serra, Urubici, Lages, Capão Alto, Cerro Negro, São José do Cerrito, Ponte Alta, Bocaina do Sul e Paniel. Os produtores que foram contemplados para participar da pesquisa, estavam em processo de regularização buscando atender todas as exigências descritas na legislação, com o objetivo de conquistar o selo de inspeção municipal e legalizar a produção e comercialização Queijo Artesanal Serrano (QAS). No período das coletas, apenas três queijarias já possuíam inspeção municipal. A estrutura física das queijarias atendia o Decreto nº 1.238, de 19 de julho de 2017, entretanto, com relação a sala de ordenha e sala espera dos animais algumas propriedades ainda não possuíam local adequado para obtenção da matéria-prima.

As coletas foram realizadas após um treinamento com os produtores de QAS, com carga horária de aproximadamente 3 horas, fornecido por extensionistas da EPAGRI em conjunto com o Centro de Diagnóstico Microbiológico Animal (CEDIMA) abordando principalmente os cuidados relacionados a higiene durante obtenção da matéria-prima e produção do QAS, e relacionando com os principais micro-organismos contaminantes durante o processo descritos na legislação. Nessa pesquisa, foram objetos de estudo além do Queijo Artesanal Serrano, a

água e o leite cru utilizados na fabricação. Esses dois pontos podem ser considerados como potenciais fontes de contaminação durante a produção de QAS.

Foram coletadas uma amostra de água e uma amostra de leite cru de cada propriedade (19 queijarias), provenientes do mesmo dia e período de fabricação das peças de QAS. Para análise dos queijos, foram coletadas quatro amostras de cada propriedade, provenientes da mesma massa e com diferentes períodos de maturação (14, 21, 28 e 35 dias), totalizando 76 amostras de QAS. Todas as peças foram identificadas e permaneceram nas salas de maturação das queijarias até a respectiva data de coleta. O processo de maturação ocorreu em condições de umidade e temperatura ambiente, e para padronização, foi estabelecido que os queijos pesassem entre 900g e 1100g no dia da fabricação.

As amostras de água foram provenientes da torneira da sala de produção das queijarias, e foram coletadas assepticamente em bags estéreis uma quantidade de 100 mL. As amostras de leite cru foram coletadas em frascos estéreis contendo 100 mL provenientes da mistura da ordenha de cada propriedade, diretamente do tanque de produção do QAS, logo após homogeneização e antes da adição do coalho.

As análises microbiológicas foram realizadas no Centro de Diagnóstico Microbiológico Animal (CEDIMA) da Universidade do Estado de Santa Catarina (UDESC) no campus do Centro de Ciências Agroveterinárias (CAV) em Lages. No dia da fabricação das peças de QAS, foram enviadas ao laboratório as amostras de água e leite, e após 14 dias foi coletada a primeira peça de QAS de cada propriedade. Todas as amostras foram devidamente acondicionadas em caixas isotérmicas, em temperatura de refrigeração entre 2-8°C, e enviadas ao laboratório para as análises microbiológicas. As demais peças permaneceram maturando até a respectiva data de coleta.

As análises realizadas no leite e queijo foram: pesquisa de *Listeria monocytogenes* e *Salmonella* sp., quantificação de Coliformes Totais, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* e aeróbios mesófilos (contagem padrão em placas). Para análise de potabilidade da água dos estabelecimentos foram pesquisados coliformes totais e *E.coli*.

Para análise microbiológica no QAS foi realizado o seguinte procedimento: após recebimento da amostra, a casca superior foi flambada e retirada para evitar que qualquer contaminação superficial entrasse em contato com o interior da massa. Na sequência, foram retirados assepticamente 50 g de vários pontos da peça, sendo que essa quantidade foi dividida em duas bags estéreis contendo 25g cada. Para a metodologia realizada no leite, após homogeneização, foram transferidos com pipeta estéril 25 mL para cada bag. Em seguida,

foram adicionados em uma das bags 225 mL de Água Peptonada Tamponada estéril (APT 1%), para pesquisa de *Salmonella* spp. e na outra 225 mL de caldo *University of Vermont* (UVM), para pesquisa de *L. monocytogenes*, ambas homogeneizadas em *Stomacher* por dois minutos.

A partir da amostra contendo APT 1%, foram realizadas diluições para dar sequência as demais análises, utilizando 1 mL do inoculo inicial, transferindo para tubo contendo 9 mL de solução salina (0,85%) e realizando as diluições até 10^{-5} . Essas diluições foram utilizadas para realizar a quantificação de coliformes totais, *E. coli* e *S. aureus* seguindo os protocolos descritos por Silva et al. (2010) utilizando o sistema *Petrifilm*TM (método validado pela *Association of Analytical Communities* – AOAC) nº 991.14 para coliformes totais e *E. coli* e nº 2003.07 para *S. aureus*. O resultado final foi dado em UFC/g (queijo) e UFC/mL (leite). As cepas utilizadas como controle foram *E. coli* (ATCC 25922) e *S. aureus* (ATCC 29213).

O protocolo de isolamento de *Salmonella* sp. foi de acordo com a ISO 6579 (2007) descrita por Silva e colaboradores (2010), em que após enriquecimento em caldo não seletivo, as amostras foram enriquecidas em Caldo Rappaport Vassilidis Soja e Tetracionato Muller Kauffmann Novobiocina (MKTTn). Após incubação foi realizado plaqueamento seletivo diferencial em Ágar Xilose Lisina Desoxicolato (XLD) e Ágar Verde Brillhante Sulfa (BGS). As colônias características foram selecionadas e submetidas aos testes bioquímicos. As cepas com perfil bioquímico compatível foram submetidas a prova de aglutinação com soro polivalente anti-salmonella para confirmação. A cepa utilizada como controle positivo foi *Salmonella* spp. ATCC 8327.

A pesquisa de *Listeria monocytogenes* foi realizada de acordo com a Instrução Normativa nº 62, que estabelece os Métodos Analíticos Oficiais Para Análises Microbiológicas Para Controle de Produtos de Origem Animal e Água (BRASIL, 2003), em que após enriquecimento seletivo primário em caldo UVM, as amostras passaram por enriquecimento seletivo secundário em caldo Fraser e na sequência, após incubação, as amostras positivas (tubos com hidrólise de esculina) passaram por plaqueamento seletivo diferencial em ágar *Listeria Selective Agar Base* (Oxford) e ágar PALCAM. Para controle positivo, foi utilizada a cepa de *L. monocytogenes* (ATCC 7644). Os isolados suspeitos, passaram por provas bioquímicas para confirmação (SILVA et al., 2010).

Para quantificação de aeróbios mesófilos (Contagem Padrão em Placas - CPP) no queijo e leite, as análises seguiram a Instrução Normativa nº 62, de 26 de agosto de 2003 (BRASIL, 2003), tomando como base os parâmetros da IN nº 7, de 3 de maio de 2016 (MAPA), que estabelece limite máximo de 300.000 UFC/mL em leite.

Para avaliação da qualidade microbiológica da água, foi utilizada a técnica quantitativa do número mais provável (NMP), passando por duas etapas, etapa presuntiva em caldo lactosado e etapa confirmatória em caldo verde brilhante (VB) para coliformes totais, e caldo EC para *E. coli*, seguindo a Instrução Normativa nº 62, de 26 de agosto de 2003 (BRASIL, 2003).

Os resultados encontrados nesse estudo foram comparados aos valores de referência do regulamento técnico geral para fixação dos requisitos microbiológicos de queijo, segundo a Portaria nº 146, de 07 de março de 1996 (BRASIL, 1996). Para potabilidade de água, os resultados encontrados foram comparados com a Portaria nº 2.914, de 12 de dezembro de 2011 (BRASIL, 2011b), e para CPP em leite, os valores encontrados foram comparados com a IN nº 7, de 3 de maio de 2016 (BRASIL, 2016).

Os resultados foram submetidos à análise de variância e regressão linear do pacote estatístico SAS, com significância ($P < 0,05$).

3.5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Nas análises de QAS, foi avaliada a influência dos períodos de maturação sobre os micro-organismos de importância em saúde pública descritos na legislação. Os resultados da frequência de isolamento e influência da maturação na quantificação das bactérias encontram-se na tabela 1.

Tabela 1 – Frequência de isolamento e influência do período de maturação sobre a média da quantificação em UFC/g em relação à Coliformes totais, *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*.

Período de Maturação	Amostras com crescimento bacteriano/ Média (UFC/g)					
	Coliformes totais	Média	<i>Escherichia coli</i>	Média	<i>Staphylococcus aureus</i>	Média
14 dias	19/19	1,625 x 10 ^{6a}	13/19	3,017 x 10 ^{5a}	13/19	9,958 x 10 ^{4a}
21 dias	17/18	1,073 x 10 ^{6b}	11/18	2,091 x 10 ^{5a}	15/19	1,018 x 10 ^{5a}
28 dias	19/19	1,159 x 10 ^{6b}	14/19	4,104 x 10 ^{5a}	11/19	3,358 x 10 ^{4b}
35 dias	19/19	3,813 x 10 ^{5b}	16/19	2,441 x 10 ^{5a}	5/19	2,633 x 10 ^{4c}
Total	74/75		54/75		44/76	

^{a,b,c} Letras diferentes na mesma coluna indicam diferença estatística ($p < 0,05$).

Fonte: Elaborada pela autora, 2018.

Com relação aos Coliformes totais, houve uma redução da população a partir de 21 dias de maturação ($p < 0,05$). Entretanto, do período de 21 dias aos 35 dias não houve redução da

população de coliformes totais ($p > 0,05$). Já para *E. coli*, não houve diferença estatística entre os períodos de maturação avaliados ($p > 0,05$). Em contrapartida, para *Staphylococcus aureus* houve uma redução significativa aos 28 dias, e na sequência aos 35 dias de maturação ($p < 0,05$).

Dias et al. (2016) cita que a maior contagem do grupo dos coliformes em relação ao *S. aureus* pode estar relacionada a competição que ocorre entre bactérias ácido lácticas e coliformes quando o pH ainda está elevado e temperatura adequada nos primeiros períodos de maturação.

A tendência no processo de maturação é a redução progressiva de patógenos devido aos processos que ocorrem, como acidificação do meio, redução da atividade de água (a_w) e competição com bactérias lácticas (ORDÓÑEZ *et al.*, 2005). Afirmando esse processo, Ortolani e colaboradores (2010) perceberam que a maturação foi essencial para redução da população de coliformes, demonstrando que os processos que ocorrem na maturação são responsáveis pela eliminação ou redução de patógenos.

Andrade et al. (2006) verificou que um período superior a 30 dias de maturação pode reduzir consideravelmente a quantidade de micro-organismos contaminantes. Nesse trabalho, não foi possível observar essa redução, provavelmente por ter o último período avaliado aos 35 dias de maturação. Possivelmente se fossem realizadas mais análises contemplando períodos de maturação superiores a 35 dias, incluindo o período de 60 dias descrito na legislação, essa redução poderia ter sido observada.

Em trabalho anterior realizado com o QAS de Santa Catarina, foram avaliados queijos com 15, 30, 45 e 60 dias de maturação. Melo et al. (2013) observou uma redução da população de coliformes totais e *E. coli* aos 30 e 45 dias de maturação, respectivamente. Houve redução da população de *S. aureus* aos 15 e 45 dias de maturação, e após esse período houve um aumento na quantificação desse micro-organismo.

No estudo realizado por Borges (2015), foram avaliados queijos do tipo Minas de leite cru com diferentes tempos de maturação em condições de umidade e temperatura ambientais. Foram quantificados os micro-organismos descritos na legislação e concluíram que os valores encontrados em todos os períodos, para a maioria dos parâmetros avaliados, ultrapassaram os limites aceitáveis, e que mesmo aos 60 dias de maturação, com teor de umidade de 9%, esse tempo não foi suficiente para garantir um produto inócuo para consumo.

Santos (2016), avaliou os efeitos do período de maturação de queijos produzidos com leite cru sobre a microbiota deteriorante, e também os teores de umidade em cada período. As peças foram avaliadas até 60 dias de maturação, iniciando no dia zero e realizando as análises a cada 10 dias. Para coliformes totais a maior contagem ocorreu com 10 dias de maturação em que os queijos apresentavam 50% de umidade, *E. coli* apresentou a maior contagem no

vigésimo dia com 33% de umidade. Com 30 dias de maturação (25% de umidade) houve redução da população de coliformes totais e *E. coli*, entretanto, aos 60 dias de maturação as contagens para esses micro-organismos não alcançaram os padrões estabelecidos na Portaria n° 146/1996 (MAPA). As condições em que foram realizadas o estudo de Santos (2016) envolveu processo de maturação com condições controladas de temperatura ($7,5 \pm 1,5$ °C) e de umidade (45 ± 5 %).

Com relação a umidade em alimentos, as bactérias Gram negativas são mais exigentes que as Gram positivas, isso significa que para manutenção no alimento, precisam de uma atividade de água maior (BORGES, 2015). Como não foram avaliados os teores de umidade do QAS nesse estudo, provavelmente os queijos com 35 dias de maturação ainda apresentavam um teor de umidade favorável para manutenção de coliformes totais e *E. coli*.

Com relação ao *S. aureus*, é uma bactéria resistente que pode crescer numa faixa de pH que varia entre 4,2 e 9,3, a atividade de água mínima que suporta é 0,85 e consegue se manter em concentrações de NaCl de até 25% (SILVA et al., 2010). Entretanto, ao contrário de outras pesquisas em que sua quantificação aumentou com o passar dos dias de maturação, no presente estudo houve uma redução significativa desses micro-organismos. Esse fenômeno pode estar associado aos elevados níveis de coliformes totais e *E. coli* encontrados ainda com 35 dias de maturação.

De acordo com Vernozy-Rozand et al. (2004), quando há uma concentração muito elevada de bactérias concorrentes, o *S. aureus* apresenta uma menor taxa de multiplicação demonstrando ser sensível à competição com outros micro-organismos. Nessas condições também não consegue produzir a enterotoxina estafilocócica. Essas interações estão sendo mais observadas em leite e queijos.

Para produzir a enterotoxina, a população necessária de *S. aureus* no alimento é de 10^6 UFC/g, que corresponde a ingestão de uma dose menor que $1 \mu\text{g}$ (SILVA et al., 2010). Nesse estudo, das 76 amostras de QAS analisadas apenas uma apresentou potencial para produção dessa enterotoxina, em um queijo com 21 dias de maturação com contagem de $1,22 \times 10^6$ UFC/g.

Para pesquisa de *Salmonella* spp. e *Listeria monocytogenes* no QAS, foram realizadas metodologias de presença/ausência desses micro-organismos, tendo como base a Portaria n° 146, de 07 de março de 1996 (MAPA) que estabelece ausência em 25g do alimento.

Nesse estudo, não houve isolamento de *Salmonella* spp. em nenhuma das amostras de QAS analisadas. Em estudos com queijos fabricados a partir de leite cru, Andrade et al. (2016), Borges (2015), Pontarolo (2014) e Melo et al. (2013), Nespolo, Taffarel e Brandelli (2009) também não isolaram *Salmonella* spp. em nenhum dos períodos de maturação avaliados. Um

dos fatores que pode ter contribuído para a não detecção de *Salmonella* spp. pode ser pela sua capacidade limitada de competir com coliformes e *Staphylococcus* sp. (BRANT; FONSECA; SILVA, 2007).

Já *L. monocytogenes*, foi isolada de quatro amostras da mesma propriedade (5,26%), em todos os períodos de maturação estudados, tornando o produto impróprio para consumo e demonstrando que a maturação não contribuiu para a eliminação desse agente infeccioso. A presença de *L. monocytogenes* nos quatro períodos de maturação também pode estar associada a capacidade do agente de tolerar concentrações de sal mais elevadas, assim como o *S.aureus* (SALES, 2015). Silva et al. (2010) cita que queijos em processo de maturação podem ser um meio ideal para crescimento de *L. monocytogenes*, e, portanto, fonte de contaminações podendo causar surtos alimentares.

A *L. monotytoenes* na indústria de alimentos gera preocupação, pois apresenta tolerância e resistência a desinfetantes, possui capacidade de formar biofilme, o que pode contaminar todo alimento que entrar em contato com a superfície contaminada. A presença de biofilme dentro da indústria alimentícia está associada à higienização precária (KLANČNIK et al., 2015).

Borges (2015) não isolou *L. monocytogenes* em nenhuma das amostras analisadas. Santos (2016) inoculou experimentalmente na massa do queijo *L. monocytogenes*, para posteriormente realizar a quantificação da bactéria nos diferentes períodos de maturação. Foi observado um aumento nas contagens aos 30 dias de maturação com umidade de 38,7%, após redução aos 40 dias (30,9% de umidade), mas aos 60 dias a contagem não seguiu a tendência de redução e houve um discreto aumento na quantificação (umidade de 25%).

Melo et al. (2013) isolou *Listeria* sp. em 21 amostras de QAS, sendo que três delas foram identificadas como *L. monocytogenes*, e isoladas aos 30 e 45 dias de maturação. Pontarolo (2014) isolou a bactéria em uma amostra de QAS aos 14 dias de maturação e em duas amostras aos 28 dias de maturação.

No atual estudo, em que foram isoladas cepas de *L. monocytogenes* em QAS da mesma propriedade, não houve detecção desse patógeno no leite, portanto, a matéria-prima não foi fonte de contaminação desse agente para o QAS. Contudo, seria válido realizar uma investigação nessa propriedade, com novas análises no QAS e superfícies de produção, para verificar se há possibilidade de as instalações estarem contaminadas com esse micro-organismo e realizar as ações necessárias para eliminação do agente.

Para avaliar se as amostras de QAS estavam próprias para consumo, os parâmetros utilizados foram de acordo com a portaria n°146, de 07 de março de 1996 (MAPA) que estipula

os valores máximos permitidos para coliformes totais, *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus* em queijos. Na tabela 2 estão apresentados os percentuais de amostras que estavam em não conformidade com a legislação, ou seja, impróprios para consumo.

Tabela 2 – Número de amostras fora dos padrões microbiológicos para coliformes totais (acima de 10^3 UFC/g), *Escherichia coli* (acima de 5×10^2 UFC/g), *Staphylococcus aureus* (acima de 10^3 UFC/g) e média da quantificação em UFC/g.

Período de Maturação	Amostras fora do padrão / Média UFC/g)					
	Coliformes totais	Média	<i>Escherichia coli</i>	Média	<i>Staphylococcus aureus</i>	Média
14 dias	15/19	$2,058 \times 10^6$	10/19	$5,733 \times 10^5$	10/19	$1,891 \times 10^5$
21 dias	13/19	$2,378 \times 10^6$	10/19	$3,993 \times 10^5$	9/19	$1,933 \times 10^5$
28 dias	12/19	$1,834 \times 10^6$	8/19	$9,746 \times 10^5$	4/19	$1,590 \times 10^5$
35 dias	11/19	$6,578 \times 10^5$	9/19	$5,153 \times 10^5$	2/19	$2,500 \times 10^5$
Total	51/76		37/76		25/76	

Fonte: Elaborada pela autora, 2018.

O percentual de amostras impróprias para consumo levando em consideração todos os períodos de maturação avaliados foram de 67,10% para coliformes totais, 48,68% para *E. coli* e 32,89% para *S. aureus*. Pontarolo (2014) avaliou um conjunto de amostras de QAS provenientes de propriedades com diferentes estruturas de produção. Algumas propriedades possuíam queijaria, outras a produção e maturação eram realizadas dentro de casa ou anexo à sala ordenha. Os utensílios utilizados não seguiam um padrão, podendo compreender formas de inox ou madeira por exemplo, sendo assim havia uma heterogeneidade na forma de fabricação do QAS em cada propriedade. Nessa realidade a autora encontrou valores semelhantes aos do estudo atual. Um percentual de não conformidade para coliformes totais de 69,35%, *E. coli* 46,77% e para *S. aureus* um valor mais elevado, 53,22%.

Em outra pesquisa realizada com QAS, os autores encontraram taxas de não conformidade menores ou semelhantes aos resultados encontrados no presente estudo. Para coliformes totais, 34,26% das amostras estavam acima do limite da legislação, para *E. coli* 36,11%. Já para *S. aureus* o percentual de não conformidade foi de 33,33% (MELO et al., 2013), valor semelhante ao encontrado na atual pesquisa, 32,89%.

Na atual pesquisa, as 19 propriedades estudadas já possuíam queijarias estruturadas, grande parte delas com sala de ordenha adequada para obtenção da matéria prima. Antes das coletas, foi realizada uma reunião no período da manhã com os produtores participantes do projeto, para dar orientações relacionadas principalmente a higiene durante obtenção do leite e

durante a produção do QAS, na tentativa e padronizar os procedimentos e reduzir contaminação no produto final. Apesar disso, na data em que foram passadas as orientações, alguns produtores não compareceram, o que de certa forma pode ter interferido nos resultados.

Levando em consideração que os resultados de Melo e colaboradores (2013), foram obtidos em uma realidade de produção diferente da atual, em que as amostras utilizadas foram adquiridas de produtores rurais que não possuíam nenhum treinamento em BPF e estrutura física adequada para fabricação do produto, produzindo e comercializando de forma totalmente informal, os resultados encontrados nesse estudo tornam-se preocupantes, já que o percentual de amostras em não conformidade foi mais elevado que o estudo anterior realizado em condições insatisfatórias.

Andrade et al. (2016), avaliando a qualidade microbiológica de queijo coalho com 18, 26, 34, e 42 dias, encontraram resultados para coliformes totais acima do limite da legislação em todos os períodos avaliados. Nespolo, Taffarel e Brandelli (2009), em trabalho realizado com queijo Fascal, produzido a partir de leite de ovelha cru, com 1, 30, 60 e 90 dias de maturação, obtiveram contagens dentro do limite da legislação em todos os períodos avaliados, sendo observada uma redução gradual de coliformes totais e *E. coli* ao longo da maturação. Já com relação ao *S. aureus*, sua população permaneceu acima do limite até 60 dias de maturação e só ficou dentro do limite permitido aos 90 dias de maturação.

Dias et al. (2016) trabalhou com queijo minas frescal em que 20% das amostras produzidas artesanalmente estavam em desacordo com a legislação para *E.coli* e 100% em desacordo para coliformes totais e *S. aureus*.

Analisando individualmente as propriedades e períodos de maturação, incluindo todos os micro-organismos descritos na legislação (Coliformes totais, *E. coli*, *Staphylococcus coagulase positivo*, *Salmonella* spp. e *Listeria monocytogenes*), aos 14 dias de maturação duas (2/19) propriedades apresentaram queijos próprios para consumo. Aos 21 dias apenas uma (1/19) propriedade obteve resultado satisfatório, e aos 28 e 35 dias houve um aumento da conformidade, em que cinco (5/19) propriedades obtiveram QAS inócuos para o consumo.

Das propriedades que possuíam produtos dentro dos padrões microbiológicos, duas estavam em conformidade em três dos quatro períodos de maturação avaliados, incluindo o primeiro período de 14 dias. Esse dado demonstra que existe uma realidade muito distinta dentro do universo das 19 propriedades, em que poucas obtiveram bons resultados enquanto a maioria precisa rever em quais pontos da produção estão falhando.

Ainda assim, apesar da maior parte das queijarias estarem fora dos padrões microbiológicos, houveram peças de QAS que aos 14 dias de maturação já se enquadravam

para consumo seguro. Destacando, portanto, que existe a possibilidade desse produto ser comercializado com período inferior a 60 dias, desde que sejam realizados novos esforços incluindo cursos de capacitação principalmente relacionados aos cuidados com a higiene durante o processo.

Assim como já ocorre no Estado de Minas Gerais, em que estudos foram realizados com queijos tradicionais e então estabelecidos períodos de maturação menores que 60 dias, como é o caso do queijo da Canastra com maturação de 21 dias, Queijo Serro com 17 dias de maturação e em Araxá pesquisas estão sendo desenvolvidas para atingir 14 dias de maturação para comercialização. Essas pesquisas são realizadas selecionando produtores cadastrados que possuem rebanho comprovadamente livre de brucelose e tuberculose e por seguirem à risca todas as normas exigidas pelo Instituto Mineiro de Agropecuária (IMA) (PASSIL, 2015).

Com relação aos micro-organismos aeróbios mesófilos, não há legislação específica que estabeleça um limite em queijos maturados produzidos a partir de leite cru, portanto, foi utilizado como parâmetro os valores estabelecidos para leite cru pela IN n° 7, de 3 de maio de 2016 (MAPA), com um limite máximo de 300.000 UFC/mL. Os valores encontrados na quantificação de aeróbios mesófilos nos diferentes períodos de maturação do queijo foram elevados quando comparados ao limite estabelecido para leite cru.

Avaliando os quatro períodos estudados, foi observada uma redução desses micro-organismos aos 21 dias de maturação ($p < 0,05$) e na sequência, houve uma redução significativa aos 28 dias ($p < 0,05$). Entretanto, mesmo com essa redução, aos 35 dias de maturação a quantificação desses micro-organismos ainda se encontravam elevada.

Aos 35 dias de maturação a quantificação dessas bactérias no QAS variou de $1,1 \times 10^6$ a $3,3 \times 10^9$ UFC/g. Ou seja, nenhuma propriedade apresentou resultado satisfatório no último período avaliado, a média das propriedades para aeróbios mesófilos aos 35 dias de maturação foi de $2,337 \times 10^8$ UFC/g.

Andrade et al. (2016), também encontrou uma elevada população de aeróbios mesófilos no queijo coalho, com um aumento de $3,5 \times 10^6$ (dia zero) para 2×10^8 UFC/g (42 dias). Pesquisando esse grupo de bactérias em queijo Minas, Wolupeck et al. (2012) encontraram contagens que variaram de $3,1 \times 10^7$ a $1,1 \times 10^9$ UFC/g, indicando deficiências no processamento, acondicionamento e/ou distribuição dos queijos.

Borges (2015), encontrou uma população elevada para aeróbios mesófilos em queijo Minas de leite cru. Com um dia de fabricação, a quantidade encontrada foi de $1,5 \times 10^9$ UFC/g. A maior população encontrada foi aos 20 dias de maturação com $3,6 \times 10^{11}$ UFC/g, e o último período avaliado, com 60 dias, obteve população de $2,1 \times 10^4$ UFC/g.

Elevadas quantificações de aeróbios mesófilos no QAS demonstram falhas higiênico-sanitárias em que o produto pode ter sido elaborado a partir de matéria-prima com alta contaminação, manipulação e processo de produção com higiene insatisfatória ou ainda com armazenamento em condições inadequadas de tempo e temperatura.

Para avaliar a qualidade microbiológica do leite utilizado na fabricação do QAS, foi realizada a técnica de Contagem Padrão em Placas (CPP). Das 19 amostras analisadas, apenas sete (36,84%) tiveram resultado satisfatório de acordo com a Instrução Normativa n° 7, de 3 de maio de 2016, que estabelece limite máximo de 3×10^5 UFC/mL, obtendo uma média de $6,467 \times 10^4$ UFC/mL. Enquanto as propriedades que ultrapassaram o limite de CPP da legislação, obtiveram uma média de $1,525 \times 10^7$ UFC/mL, em que os resultados variaram de $5,1 \times 10^5$ até $7,5 \times 10^7$ UFC/mL.

Medeiros (2017) avaliou a qualidade de leite utilizado em queijarias artesanais informais, produtoras de queijo coalho e manteiga no Rio Grande do Norte, os resultados encontrados na CPP extrapolaram os limites máximos descritos na legislação em todas as queijarias participantes.

Em trabalho realizado por Pinto et al. (2012), utilizando a técnica de CPP para avaliar a qualidade do leite cru produzido nos estados do Paraná, São Paulo e Minas Gerais, encontraram um percentual de não conformidade de 16% (PR), 24% (SP) e 20% (MG), no período em que a pesquisa foi realizada, entre 2006 e 2007 o limite era de 10^6 UFC/mL. Sequetto et al. (2017), avaliando a qualidade microbiológica do leite cru pelo tipo de ordenha realizada e armazenamento, analisaram 10 tanques de expansão e obtiveram 40% das amostras acima do limite para aeróbios mesófilos.

Segundo Oliveira et al. (2010), dentre os produtos de origem animal, o leite e seus derivados, principalmente queijos produzidos artesanalmente, tem uma maior chance de serem contaminados. A utilização de matérias-primas de fontes não seguras, utensílios contaminados, assim como fabricação e armazenamento em condições inadequadas são condições que levam a um aumento de bactérias que causam deterioração, diminuição do prazo de validade dos alimentos, além de elevar as chances de transmissão de patógenos de origem alimentar.

O leite consumido “in natura” passa por processo térmico, seja na indústria ou em nível doméstico. Esse processo pode eliminar micro-organismos mesófilos, grupo em que se enquadra a maioria das bactérias patogênicas, e ainda contribuiu aumentando a vida de prateleira (FORSYTHE, 2013; MORAES, 2005). No caso do QAS o leite é utilizado cru, logo, se o processo de obtenção do leite não possuir um controle higiênico-sanitário eficaz, pode

ocorrer uma elevada contagem de bactérias patogênicas e deteriorantes e conseqüentemente são transferidas para o queijo (PEREIRA, 2014).

A CPP é considerada como um dos principais métodos para avaliação da qualidade de leite cru, e quando acima do limite estabelecido na normativa, pode indicar algumas falhas no processo. A contaminação inicial após a ordenha, pode ser proveniente de falhas relacionadas a limpeza e higiene de equipamentos e utensílios que entram em contato com o leite, má higienização dos tetos antes da ordenha e também animais com mastite (TAFFAREL et al., 2013).

Outro fator que contribui para o aumento da CPP é a multiplicação bacteriana, e essa atividade pode ser evitada basicamente pelo controle de tempo e temperatura de armazenamento (CASSOLI; MACHADO, 2016). Segundo Pereira et al. (2014) um indicativo de qualidade higiênica do leite cru é a baixa quantidade de micro-organismos presentes.

O percentual de não conformidade relacionado à CPP no leite encontrado nesse estudo, é alto (63,16%) quando comparado à trabalhos realizados anteriormente com QAS. Pontarolo (2014) encontrou um total de 48,39% de não conformidade com relação a CPP, e acredita que existe uma variabilidade no manejo sanitário das propriedades com falta de estrutura adequada, déficit de higiene da ordenha e controle efetivo de mastite. Da mesma forma, o resultado encontrado nesse estudo pode ser efeito da deficiência de todos os fatores citados, relacionados à higiene da ordenha e armazenamento do produto.

É importante salientar, que nem todas as propriedades possuíam local de espera e estrutura de sala de ordenha adequada para obtenção do leite. Alguns locais ainda utilizavam galpões de chão batido ou não possuíam sala de espera com piso de fácil lavagem que evitasse a formação de lama, o que pode contribuir para acúmulo de sujidades no úbere e tetos dos animais.

Em uma das propriedades foi relatado que no dia anterior a coleta de leite e água, os detergentes utilizados na higienização do equipamento de ordenha tinham acabado e, portanto, não estavam utilizando os produtos para realizar a higienização do equipamento. Falha grave que refletiu em elevadas contaminações no produto final dessa queijaria.

A rotina de higienização diária com água quente e detergente alcalino, e pelo menos uma vez na semana com detergente ácido, são essenciais para manter os equipamentos utilizados na ordenha limpos, diminuindo as chances de formação de biofilme e evitando contaminação por micro-organismos em ordenhas posteriores (LUZ et al., 2011).

Erros como esse ainda são comuns de acontecer, apesar da maioria das propriedades possuir boa estrutura de ordenha, muitas vezes simples, mas funcional para trabalho, as vezes

deixam a desejar nos procedimentos básicos, talvez por falta de conhecimento ou na tentativa de economizar os produtos, não visualizando as consequências que essas condutas podem gerar futuramente, como a comercialização de um alimento de baixa qualidade e que pode ocasionar um grave problema de saúde pública.

Relacionando os resultados da quantificação de aeróbios mesófilos no QAS e leite, é possível concluir que não houve efeito significativo da contaminação inicial do leite sobre os queijos de 14 dias de maturação analisados ($p>0,05$), apesar de grande parte das amostras de leite estarem em desacordo com a legislação. Portanto, provavelmente a elevada quantificação desse grupo de bactérias no QAS está associada à problemas de higiene durante a manipulação do produto.

Para correlacionar com os resultados encontrados no QAS, além de aeróbios mesófilos, coliformes totais, *E. coli*, *S. aureus*, *L. monocytogenes* e *Salmonella* spp. também foram pesquisados no leite, com intuito de investigar a origem da contaminação do QAS.

Nesse estudo 89,47% (17/19) das amostras de leite apresentaram coliformes totais e 10,52% (2/19) tiveram presença de *E.coli*. Sequetto et al. (2017) encontraram 80% das amostras contaminadas por coliformes totais e 40% com *E.coli*. Dados que evidenciam as falhas higiênico-sanitárias na obtenção e armazenamento do leite cru e chamam atenção para a necessidade de orientações técnicas aos produtores rurais.

Mesmo que não exista limite para coliformes no leite cru, quando presentes causam preocupação, pois indicam falhas de higiene durante o processo de ordenha, da mesma forma que os aeróbios mesófilos (DANTAS et al., 2013).

As quantificações de coliformes totais, *E.coli*, e *S. aureus* obtidas no leite, foram comparadas aos valores encontrados nos queijos com 14 dias de maturação. Os resultados obtidos indicaram que a contaminação encontrada no leite para esses micro-organismos não teve efeito significativo na contaminação encontrada nos queijos de 14 dias ($p>0,05$). Essa informação reforça que houveram problemas relacionados à higiene durante manipulação dentro das queijarias e déficit nas boas práticas de fabricação, levando em consideração o número de amostras que se apresentaram fora dos padrões microbiológicos adequados, com contagens bacterianas elevadas.

No trabalho desenvolvido por Pontarolo (2014), a contagem de *S. aureus* no leite, ao contrário desse estudo, demonstrou uma relação significativa ($p<0,05$) sobre a qualidade do queijo de 14 dias. Enquanto coliformes totais e *E. coli* não apresentaram correlação.

No leite não houve isolamento de *Salmonella* spp. e *L. monocytogenes* em nenhuma amostra. Portanto, as cepas de *L. monocytogenes* isoladas dos queijos da mesma propriedade

nesse estudo, não foram provenientes da matéria-prima, indicando que possivelmente a contaminação por esse agente teve origem no interior da queijaria. Nero (2005), avaliando 210 amostras de leite cru de 4 regiões distintas do país, também não detectou a presença de *L. monocytogenes* e *Salmonella* spp., mas relatou altas contagens de aeróbios mesófilos, coliformes totais e *E.coli*.

Em estudo avaliando as condições microbiológicas de leite cru produzido na região agreste de Pernambuco, 53 amostras foram analisadas. Foram detectadas altas contagens de coliformes totais, *E.coli*, *Staphylococcus aureus* e aeróbios mesófilos. Já nas pesquisas de *Samonella* spp. e *L. monocytogenes*, revelaram ausência desses dois micro-organismos em todas as amostras (MATTOS, 2010).

Também com o objetivo de investigar a origem das contaminações no QAS, foi realizada análise de potabilidade da água das queijarias pesquisando coliformes totais e *E.coli*. O padrão de potabilidade de água estabelecido pela Portaria n° 2.914, de 12 de dezembro de 2011 do Ministério da Saúde, para coliformes totais e *E.coli*, é ausência em 100 mL da amostra analisada (BRASIL, 2011b).

Nesse estudo, das 19 amostras analisadas 10 (52,63%) apresentaram resultados insatisfatórios, com presença de coliformes totais, ultrapassando o limite da legislação. Já para o segundo parâmetro, não houve presença de *E. coli* em nenhuma das amostras analisadas.

Em trabalho semelhante realizado por Pontarolo (2014), o autor encontrou um total de 41,94% de amostras de água em não conformidade para coliformes totais e 3,23% de amostras em não conformidade para *E. coli*. Deve-se estar atento as condições de potabilidade da água das propriedades, pois uma água contaminada pode transferir a carga bacteriana para o leite e seus derivados levando a um problema de saúde pública, além de ocasionar um aumento na CBT do leite (PICININ, 2010).

Os valores encontrados nas 10 propriedades com água contaminada por coliformes totais variaram de 2 a 17 NMP/100mL. Apesar de algumas amostras terem se apresentado fora dos padrões de potabilidade, não houve influência significativa da contaminação por coliformes totais da água das propriedades sobre os queijos de 14 dias de maturação e leite cru utilizado na produção.

Pontarolo (2014) também fez essa mesma avaliação e obteve os mesmos resultados, de que a qualidade microbiológica da água das propriedades não influenciou a contaminação por coliformes e *E. coli* no leite e queijo de 14 dias de maturação.

Utilizando como exemplo uma das propriedades, em que teve resultado de 2 NMP/100 mL na água, significa que essa amostra apresentou um valor estimado de duas células viáveis

em 100 mL da água analisada, enquanto que no queijo da mesma propriedade, com 14 dias de maturação, o resultado encontrado foi de 2.500.000 UFC/g para coliformes totais, uma quantidade exacerbada quando comparada a legislação que permite apenas 1.000 UFC/g.

A baixa quantificação de coliformes totais e ausência de *E. coli* na água das propriedades pode estar ligada aos cuidados que os produtores possuem realizando a proteção das fontes de água, cercando o local, mantendo uma vegetação nativa ao redor, higienizando com frequência as caixas d'água e realizando tratamento com cloro.

Uma explicação para que essas contaminações tenham ocorrido, mesmo com todos os cuidados realizados, pode ser por falta de orientações aos produtores em como realizar o processo de cloração, ou até mesmo falhas na armazenagem desse produto, acarretando em erros na diluição em que a dosagem mínima de cloro residual livre não é atingida (PEREIRA et al., 2014).

De acordo com a Portaria nº 2914/2011 do Ministério da Saúde, para que haja efetividade do cloro na eliminação dos micro-organismos presentes na água, a concentração deve ser de no mínimo 0,2 mg/L e no máximo 2 mg/L de cloro residual livre em toda a extensão do sistema de distribuição (BRASIL, 2011b).

Outro fator que pode contribuir alterando a qualidade da água são as chuvas, ocasionando escoamento superficial e podendo levar contaminação através de fezes de animais para perto da nascente ou fonte de água utilizada (GELDREICH, 1998). Portanto, é de suma importância que os produtores realizem análises periodicamente para verificar as condições em que se encontra a água utilizada na fabricação dos queijos, zelando por qualidade em todas as etapas de produção.

Em trabalho realizado por Medeiros (2016), avaliando a produção de queijos artesanais a partir de leite cru (coalho e manteiga), obtiveram altas quantificações para esses dois micro-organismos na água das queijarias avaliadas. Isso ocorreu, pois, a água utilizada nesses estabelecimentos era proveniente de poços artesanais sem nenhum tratamento antes da utilização. Fator determinante para uma elevada contaminação, divergindo dos resultados encontrados no presente estudo, já que as propriedades realizam o tratamento da água.

Portanto, mesmo que algumas amostras tenham apresentado contaminações, a água das propriedades não foi fator crucial para determinar a baixa qualidade do produto final. Alguns ajustes devem ser realizados com relação a potabilidade da água, já que mesmo não interferindo na qualidade do produto final, apresentaram um padrão de não conformidade frente a legislação. Para melhor controle, procedimentos como averiguação da concentração de cloro, verificação

da manutenção de proteção das fontes, sistema de canos, caixa d'água e coleta de amostras para análises microbiológicas, devem ser realizados com frequência.

3.6 CONCLUSÃO

Com esse estudo, ainda não foi possível estabelecer um período de maturação inferior ao estabelecido na legislação. Os resultados encontrados nas queijarias demonstram uma heterogeneidade nos processos de produção, principalmente envolvendo a higiene durante a manipulação do produto, o que refletiu diretamente na qualidade higiênico-sanitária do QAS. Isso demonstra a necessidade da padronização dos procedimentos realizados dentro das queijarias, com cursos de capacitação frequentes, fiscalização dos órgãos responsáveis e comprometimento dos produtores em relação as normas exigidas.

3.7 REFERÊNCIAS

ANDRADE, V. O. et al. **Qualidade microbiológica de queijo coalho**. In: I Congresso Internacional de Ciências Agrárias, 2016, Pernambuco. Pôster. Pernambuco: Cointer, v. 1, p. 1 – 6, 2016. Disponível em: <<http://cointer-pdvagro.com.br/wp-content/uploads/2016/12/QUALIDADE-MICROBIOLÓGICA-DE-QUEIJO-DE-COALHO.pdf>>. Acesso em: 03 mar. 2018.

ANDRADE, C.C.P. et al. **Estudo de Bactérias Lácticas na Produção de Queijo Serrano**. In: REUNIÃO ANUAL DA SBPC, 58, 2006, Florianópolis-SC. Disponível em: <http://www.sbpnet.org.br/livro/58ra/JNIC/RESUMOS/resumo_3563.html>. Acessado em: 9 fev. 2018.

BORGES, L. C. **Efeitos do processo de maturação sobre a microbiota autóctone de queijo produzido com leite cru**. Trabalho de conclusão de curso (Graduação em Medicina Veterinária) – Universidade de Brasília, Brasília, 2015.

BRANT, L. M. F.; FONSECA, L. M.; SILVA, M. C. C. Avaliação da qualidade microbiológica do queijo de minas artesanal do Serro - MG. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.** Belo Horizonte, v.59, n.6, p. 1570 – 1574, 2007. Disponível em: <<http://www.vet.ufmg.br/editora/arquivo-brasileiro-de-medicina-veterinariaezootecnia>>. Acesso em: 02 mar. 2018.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento – MAPA. **Portaria nº 146 de 07 de março de 1996**. Aprova os Regulamentos Técnicos de Identidade e Qualidade dos Produtos Lácteos. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília, 07 mar. 1996.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução normativa n. 62, de 26 de agosto de 2003. **Oficializa os métodos analíticos para análises microbiológicas para controle de produtos de origem animal e água**. Diário Oficial da União. Disponível em: <<http://extranet.agricultura.gov.br/sislegisconsulta/consultarLegislacao.do?operacao=visualizar&id=2851>>. Acesso em: 03 out. 2016.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Diário Oficial da União. **Instrução Normativa Nº 57. Brasília, 16 de dezembro de 2011**. Brasília. (2011a).

BRASIL. Portaria nº 2.914, de 12 de dezembro de 2011. Dispõe sobre os procedimentos de controle e de vigilância da qualidade da água para consumo humano e seu padrão de potabilidade. **Portaria Nº 2.914, de 12 de dezembro de 2011**. Brasília. (2011b).

BRASIL. **Instrução Normativa nº 84, de 07 de maio de 2016**. Aprova o Regulamento Técnico de Produção, Identidade e Qualidade do Leite tipo A, o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Leite Cru Refrigerado, o Regulamento Técnico da Coleta de Leite Cru Refrigerado e seu Transporte a Granel. Brasília, Seção 1, p. 11-11, 2016.

CASSOLI, L.D et al. Clínica do Leite. Piracicaba: ESALQ/USP, L. D.; MACHADO, P. **Mapa da qualidade do leite: Contagem Bacteriana Total**. 2016.

CÓRDOVA, U. de A. et al. **O queijo artesanal serrano nos campos do Planalto das Araucárias catarinense**. Florianópolis: EPAGRI, 2011.

CÓRDOVA, U. de A.; SCHLICKMANN, F. A. de F. de M. B.; PINTO, C. E. **A contribuição do Queijo Artesanal Serrano para o desenvolvimento regional e preservação dos campos de altitude do sul do Brasil. Desenvolvimento Regional em Debate: Revista eletrônica do Programa de Mestrado em Desenvolvimento Regional da Universidade do Contestado**, Canoinhas, v. 4, n. 2, p.103-114, 2014. Semestral. Disponível em: <<http://www.periodicos.unc.br/index.php/drd/article/view/727>>. Acesso em: 29 set. 2016.

DANTAS, D. S. et al. Qualidade microbiológica do queijo de coalho comercializado no município de Patos, Estado da Paraíba. **ACSA**, Patos, v. 9, n. 3, p. 110-118, 2013.

DIAS, B. F. et al. Qualidade microbiológica e físico-química de queijo minas frescal artesanal e industrial. **Revista de Agricultura Neotropical**, Cassilândia-MS, v. 3, n. 3, p. 57-64, 2016.

EPAGRI. **Queijo Artesanal Serrano: História, cultura e geração de renda nos campos de altitude no sul do Brasil**. Florianópolis: EPAGRI/GMC, 2013.

FORSYTHE, S. J. **Microbiologia da segurança dos alimentos**. 2 ed. ARTMED. 2013.

GELDREICH, E. E. **The bacteriology of water**. In: *Microbiology and microbial infections*. 9th ed. London: Arnold, 1998.

GERMANO, P. M. L.; GERMANO, M. I. S. **Higiene e vigilância sanitária de alimentos**. 4. ed. Barueri: Manole, 2010.

KLANČNIK, A.; TOPLAK, N.; KOVAČ, M.; JERŠEK H. M. B. Quantification of *Listeria monocytogenes* cells with digital PCR and their biofilm cells with real-time PCR. **Journal of Microbiological Methods**, v. 118, p. 37– 41, 2015.

LUZ, J. C. et al. **Queijo artesanal serrano: manual técnico para a implantação de boas práticas de fabricação**. Porto Alegre: EMATER/RS-ASCAR, p. 72, 2011.

MATTOS, M. R. et al. Qualidade do leite cru produzido na região do agreste de Pernambuco, Brasil. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 31, n. 1, p.173-180, 2010. Disponível em: <<http://www.redalyc.org/html/4457/445744095016/>>. Acesso em: 01 mar. 2018.

MEDEIROS, N. C. **Qualidade do leite utilizado em queijarias artesanais no Rio Grande do Norte**. 2017. 44f. Dissertação (Mestrado) – Curso de Pós-Graduação em Ciência Animal, Universidade Federal Rural do Semi-Árido, Mossoró, 2017.

MEDEIROS, J. M. S. **Artisanal cheese production: evaluation of processing conditions, sanitary hygienic quality and physicochemical coalho and butter cheese type**. 2016. 58 f. Dissertação (Mestrado em Sanidade e Produção Animal) - Universidade Federal Rural do Semi-Árido, Mossoró, 2016.

MORAES, C.R. **Qualidade bacteriológica de leite bovino de mistura, in natura e beneficiado, e detecção sorológica de Brucelose em rebanhos da Região Metropolitana**

de Porto Alegre. 78 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente) – Universidade federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS-BR, 2005.

NERO, L. A. ***Listeria monocytogenes* e *Salmonella* spp em leite cru produzido em quatro regiões no Brasil, fatores que interferem sua detecção.** 2005. 141 f. Tese (Doutorado em Engenharia de Alimentos) Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo.

NESPOLO, C. R.; TAFFAREL, J. A. S.; BRANDELLI, A. Parâmetro microbiológicos e físico-químicos durante a produção e maturação do queijo Fascal. **Acta Scientiae Veterinariae**, Porto Alegre, v. 37, n. 4, p.323-328, 2009.

ORDÓÑEZ, J. A. et al. **Tecnologia de Alimentos: Alimentos de Origem Animal.** Porto Alegre: Artmed, p. 279, 2005.

ORTOLANI, M. B. T. YAMAZI, A. K.; MORAES, P. M. Microbiological quality and safety of raw milk and soft cheese and detection of autochthonous lactic acid bacteria with antagonistic activity against *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* spp., and *Staphylococcus aureus*. **Foodborne Pathogens and Disease**, New Rochelle, v.7, n. 2, p. 175 – 180, 2010
Disponível em: <<http://online.liebertpub.com/doi/pdf/10.1089/fpd.2009.0390>>. Acesso em: 03 mar. 2018.

PASSIL, L. **Pesquisa da UFMG garante: 14 dias de cura é suficiente para os queijos em Araxá.** 2015. Disponível em: <<http://www.sertaobras.org.br/2015/11/27/pesquisada-da-ufmg-garante-14-dias-e-suficiente-para-a-maturacao-de-queijos-em-araxa/>>. Acesso em: 05 fev. 2018.

PEREIRA, B. P. et al. Implicações do processo produtivo na qualidade do queijo artesanal Serrano. **REGET**, v. 18. Ed. Especial, 2014. Disponível em: <<http://cascavel.ufsm.br/revistas/ojs2.2.2/index.php/reget/article/view/13183>> Acesso em: 10 de jan. 2018.

PEREIRA, D. A. et al. Characterization of water supply systems of artisanal cheese plant of Campos das Vertentes microregion. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, Juiz de Fora, v. 69, n. 4, p. 258-267, 2014. Disponível em: <<https://www.revistadoilct.com.br/rilct/article/view/314/325>>. Acesso em: 27 fev. 2018.

PICININ, L. C. A. **Quantidade e qualidade da água na produção de bovinos de leite.** In: Simpósio De Produção Animal E Recursos Hídricos, 1., 2010, Concórdia. Anais... Concórdia: Embrapa Suínos e Aves, p. 57-71, 2010.

PINTO, M. S. et al. Contagem bacteriana total do leite cru produzido no Paraná, São Paulo e Minas Gerais após implementação da Instrução Normativa nº51/2002. **PUBVET**, Londrina, v. 6, n. 12, p.1331, 2012.

PONTAROLO, G. H. **Qualidade e inocuidade do Queijo Artesanal Serrano, do leite e da água utilizados na sua produção, em Santa Catarina.** 2014. 96 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Ciência Animal, Medicina Veterinária, Universidade do Estado de Santa Catarina, Lages, 2014. Disponível em: <http://www.cav.udesc.br/arquivos/id_submenu/757/dissertacao_mca_giane_helenita_pontarolo.pdf>. Acesso em: 26 fev. 2018.

SALES, G. A. **Caracterização microbiológica e físico-química de queijo Minas artesanal da microrregião de Araxá-MG durante a maturação em diferentes épocas do ano.** 2015. 107 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Ciência Animal, UFMG, Belo Horizonte, 2015. Disponível em: <<http://www.bibliotecadigital.ufmg.br/dspace/handle/1843/SMOC-A4MHTZ>>. Acesso em: 04 mar. 2018.

SANTA CATARINA. **Decreto N° 1.238 de 19 de julho de 2017:** Regulamenta a Lei nº 17.003, de 2016, que dispõe sobre a produção e comercialização do queijo artesanal serrano, no Estado de Santa Catarina. Florianópolis, SC, 2017. Disponível em: <<http://www.cidasc.sc.gov.br/inspecao/files/2012/08/Decreto-1238-2017-PDF-SCC-6258-2017.pdf>>. Acesso em: 11 abr. 2018.

SANTOS, A. J. P. **Efeitos do período de maturação de queijos sobre a microbiota deteriorante e *Listeria monocytogenes*.** 2016. 23 f. Dissertação (Mestrado em Saúde Animal) -Universidade de Brasília, Brasília, 2016.

SEAPA - Secretaria de Agricultura do Estado do Rio Grande do Sul. **Portaria nº 214, de 14 de dezembro de 2010.** Aprova o regulamento técnico para fixação e identidade de Queijo artesanal Serrano, 2010. Disponível em: <http://www.normasdobrasil.com.br/norma/portaria-214-2010-rs_1554444.html>. Acesso em: 12 jan. 2018.

SEQUETTO, P. L. et al. Avaliação da qualidade microbiológica de leite cru refrigerado obtido de propriedades rurais da zona da mata mineira. **Revista Brasileira de Agropecuária Sustentável**, Viçosa, v. 7, n. 1, p.42-50, 2017.

SILVA, N. da. et al. **Manual de métodos de análise microbiológica de alimento e água**. São Paulo: Varela, 2010.

TAFFAREL, L.E. et al. Contagem bacteriana total do leite em diferentes sistemas de ordenha e de resfriamento. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 80, n. 1, 2013. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1808-16572013000100002&lang=pt. Acesso em: 15 de fevereiro de 2018.

VERNOZY-ROZAND, C. et al. **Comparison of three immunological methods for detecting staphylococcal enterotoxins from food**. Letters in Applied Microbiology, v. 39, p. 490– 494, 2004.

WOLUPECK, H. L. et al. Evolução da qualidade microbiológica de queijo Minas frescal comercializado em Curitiba (PR) no intervalo de 10 anos (1999 e 2009). **Revista Acadêmica Ciências Agrárias e Ambientais**, v. 10, n. 3, p.243-252, 2012.

4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados obtidos nesse estudo, reforçam que as pessoas envolvidas na produção do QAS precisam passar por processos contínuos de capacitação de BPA e BPF por pessoal especializado na área, para obter uma linha de produção padronizada e manter as análises microbiológicas de queijo, leite e água com resultados positivos e contínuos, respeitando os critérios exigidos pela fiscalização. A utilização de algumas queijarias como modelo, que obtiveram resultados satisfatórios, seria uma ferramenta interessante para auxiliar na melhoria das demais. Assim, alcançando um grau de equivalência e qualidade da produção, para que novos estudos sejam realizados afim de avaliar a possibilidade da redução do tempo de maturação.

REFERÊNCIAS GERAIS

BARANCELLI, G.V. et al. *Listeria monocytogenes*: ocorrência em produtos lácteos e suas implicações em saúde pública. **Arq. Inst. Biol.**, São Paulo, v.78, n.1, p.155-168, 2011.

BORGES, M. F. et al. ***Listeria monocytogenes* em leite e produtos lácteos**. Fortaleza: Embrapa Agroindústria Tropical, 2009. Disponível em: <http://www.cnpat.embrapa.br/cnpat/cd/jss/acervo/Dc_119.pdf>. Acesso em: 04 fev. 2018.

BORGES, M. F. et al. ***Staphylococcus enterotoxigênicos* em leite e produtos lácteos, suas enterotoxinas e genes associados**: revisão. B. CEPPA, v. 26, n.1, p. 71-86, 2008.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento – MAPA. **Portaria nº 146 de 07 de março de 1996**. Aprova os Regulamentos Técnicos de Identidade e Qualidade dos Produtos Lácteos. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília, 1996.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional da Vigilância Sanitária- ANVISA. **Resolução - RDC nº 216, de 15 de setembro de 2004**. Dispõe sobre o regulamento técnico de boas práticas para serviços de alimentação. Diário Oficial da União, Brasília, 2004. Disponível em: <<http://portal.anvisa.gov.br/documents/33916/389979/Cartilha+Boas+Pr%C3%A1ticas+para+Servi%C3%A7os+de+Alimenta%C3%A7%C3%A3o/d8671f20-2dfc-4071-b516-d59598701af0>>. Acesso em: 31 jan. 2018.

BRASIL. **Portaria nº 2.914, de 12 de dezembro de 2011**. Dispõe sobre os procedimentos de controle e de vigilância da qualidade da água para consumo humano e seu padrão de potabilidade. Brasília, 2011a.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Diário Oficial da União. **Instrução Normativa Nº 57, de 16 de dezembro de 2011**. Brasília, 2011b. Disponível em: <<http://sertaobras.org.br/wp-content/uploads/2011/12/Instruc%CC%A7a%CC%83o-Normativa-n57.pdf>>. Acesso em: 30 set. 2016.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Manual técnico de diagnóstico laboratorial de *Salmonella* spp.: diagnóstico laboratorial do gênero *Salmonella*** / Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde, Fundação Oswaldo Cruz. Laboratório de Referência Nacional de Enteroinfecções Bacterianas, Instituto Adolfo Lutz. – Brasília: Ministério da Saúde, p. 60, 2011d.

BRASIL. **Instrução Normativa nº 84, de 07 de maio de 2016.** Aprova o Regulamento Técnico de Produção, Identidade e Qualidade do Leite tipo A, o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Leite Cru Refrigerado, o Regulamento Técnico da Coleta de Leite Cru Refrigerado e seu Transporte a Granel. Brasília, Seção 1, p. 11-11, 2016.

CARDOSO, A. L. S. P. et al. Pesquisa de coliformes totais e coliformes fecais analisados em ovos comerciais no laboratório de patologia avícola de Descalvado. **Arq. Inst. Biol.** São Paulo.; v. 68 n. 1, p.10–20, 2001.

CARVALHO, M. M.; LINDNER, J. D.; FARIÑA, L. O. A produção de queijo colonial artesanal no município de Seara, Estado de Santa Catarina, frente à legislação brasileira. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, v. 70, n. 5, p. 253-261, 2016.

CERRI, C. **A produção artesanal, uma das principais referências culinárias de Minas Gerais, enfrenta o desafio de adaptar-se a novas exigências sanitárias sem perder a singularidade de suas receitas tradicionais.** 2002. Disponível em: <<http://revistagloborural.globo.com/GloboRural/0,6993,EEC304497-1641-6,00.html>>. Acesso em: 24 jan. 2018.

CÓRDOVA, U. de A. et al. **O queijo artesanal serrano nos campos do Planalto das Araucárias catarinense.** Florianópolis: Epagri, 2011.

CÓRDOVA, U. de A.; SCHLICKMANN, F. A. de F. de M. B.; PINTO, C. E. **A contribuição do Queijo Artesanal Serrano para o desenvolvimento regional e preservação dos campos de altitude do sul do Brasil.** Desenvolvimento Regional em Debate: Revista eletrônica do Programa de Mestrado em Desenvolvimento Regional da Universidade do Contestado, Canoinhas, v. 4, n. 2, p. 103-114, 2014. Semestral. Disponível em: <<http://www.periodicos.unc.br/index.php/drd/article/view/727>>. Acesso em: 29 set. 2016.

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

DANTAS, D. S. et al. **Qualidade microbiológica do queijo de coalho comercializado no município de Patos, Estado da Paraíba.** ACSA, Patos, v. 9, n. 3, p. 110-118, 2013.

DINIZ, M. F. S. **Queijo Canastra: um estudo envolvendo aspectos culturais e parâmetros de inocuidade do alimento.** Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 159 f., 2013.

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

DORES, M.T. **Queijos artesanais da Canastra maturado a temperatura ambiente e sob refrigeração**. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos). Viçosa, MG: UFV, p. 106, 2007.

EPAGRI. **Queijo Artesanal Serrano: História, cultura e geração de renda nos campos de altitude no sul do Brasil**. Florianópolis: EPAGRI/GMC, 2013.

FARIA, A. C. S. et al. Short communication: Viable *Mycobacterium avium* subspecies paratuberculosis in retail artisanal coalho cheese from Northeastern Brazil. **Journal of Dairy Science**, v. 97, n. 7, p. 4111-4114, 2014.

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

FDA (Food and Drug Administration). **Bad bug book, foodborne pathogenic microorganisms and natural toxins handbook**. 2000. Disponível em: <http://pdf.usaid.gov/pdf_docs/Pnado152.pdf>. Acesso em: 31 jan. 2018.

GERMANO, P. M. L.; GERMANO, M. I. S. **Higiene e vigilância sanitária de alimentos**. 4. ed. Barueri: Manole, 2010.

IDE, L. P. A.; BENEDET, H. D. Contribuição ao Conhecimento do Queijo Colonial Produzido na Região Serrana de Santa Catarina, Brasil. **Ciência e Agrotecnologia, Lavras**, v. 25, n. 6, p. 1351 – 1358, 2001. Disponível em: <http://www.editora.ufla.br/_adm/upload/revista/25-6-2001_13.pdf>. Acesso em: 30 set. 2016.

KAMIYAMA, C. M.; OTENIO, M. E. Aspectos sobre qualidade da água e qualidade de produtos na indústria de laticínios. **Revista Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, v. 68, n. 391, p. 42-50, 2013.

LEITE, A. M. O., FRANCO, R. M. Coliformes totais e *Escherichia coli* em coxas de frango comercializados no Rio de Janeiro. **Revista Brasileira de Ciência Veterinária**, v.13 n. 2, 2006.

LENZI, A. **Governo do Estado sanciona lei que regulamenta produção e comercialização de queijos artesanais em SC.** 2018. Disponível em:

<<http://www.sc.gov.br/index.php/noticias/temas/desenvolvimento-economico/governo-do-estado-sanciona-lei-que-regulamenta-producao-e-comercializacao-de-queijos-artesanais-em-sc>>. Acesso em: 25 jan. 2018.

LONG, M. **Exames obrigatórios para manipuladores de alimentos.** 2016. Disponível em: <<https://trofitic.com/exames-obrigatorios-manipuladores-de-alimentos/>>. Acesso em: 31 jan. 2018.

LUZ, J. C. et al. **Queijo artesanal serrano: manual técnico para a implantação de boas práticas de fabricação.** Porto Alegre: EMATER/RS-ASCAR, p.72, 2011.

MACEDO, V. F. et al. Prevalência de coliformes e *Staphylococcus aureus* em mãos de manipuladores de alimentos de feira livre de Vitória, ES. **Salus J Health Sci.**, v. 2, n. 2, p. 27-38, 2016.

MARMETINI, P. R.; RONQUI, L.; ALVARENGA, O. V. A importância das boas práticas de manipulação para os estabelecimentos que manipulam alimentos. **Revista Científica Facimed**, p. 263-273, 2010. Disponível em: <<http://www.facimed.edu.br/o/revista/pdfs/8770b901b3aff4febc857ec524d8cb40.pdf>> Acesso em: 31 jan. 2018.

MARCOS, A. **Cheese: chemistry, physics and microbiology.** General aspects. Cap 11 – Water activity in cheese in relation to composition, stability and safety. London U. K. 1993. Chapman & Hall, 2. Ed., v. 1, p. 439 – 469, 1993.

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

MARQUES, A. V et al. Investigação Da Qualidade Microbiológica De Amostras De Leite Cru Produzidos Na Fazenda Experimental Do Instituto De Ciências Agrárias Da Universidade Federal De Minas Gerais (UFMG). **Revista de Educação Continuada em Medicina Veterinária e Zootecnia do CRMV-SP**, Jaboticabal, v. 14, n. 3, p. 91-91, 2016. Disponível em: <<file:///D:/Downloads/34983-79600-1-SM.pdf>>. Acesso em: 25 jan. 2018.

MELO, F. D. et al. Avaliação da inocuidade e qualidade microbiológica do queijo artesanal serrano e sua relação com as variáveis físico químicas e o período de maturação. **Acta Scientiae Veterinariae**, Porto Alegre, v. 41, 2013. Disponível em: <<http://www.ufrgs.br/actavet/41/PUB%201152.pdf>>. Acesso em: 30 set. 2016.

MENDONÇA, R. C. S.; VIEIRA, E. N. R.; OLIVEIRA, K. A. M. **Patógenos na indústria de carnes**. Microbiologia de Alimentos: qualidade e segurança na produção e consumo. Editado por Regina Célia Santos Mendonça. Viçosa, p. 209, 2003.

MINAS GERAIS. **Portaria nº 1305, de 30 de abril de 2013 do Instituto Mineiro de Agropecuária (IMA)**. Estabelece diretrizes para a produção do queijo Minas artesanal. Diário Oficial do Executivo, 2013.

MURRAY, P.R.; ROSENTHAL, K.S.; PFALLER, M. A. **Microbiologia Médica**. 7th ed. Rio de Janeiro: Elsevier, p.33, 2014.

NARIMATSU, A. et al. Avaliação da proteólise e do derretimento do queijo prato obtido por ultrafiltração. **Ciência Tecnologia Alimentar** v.23, p.177-182, 2003.

NOLLA A. C, CANTOS G. A. Ocorrência de enteroparasitas em indivíduos que manipulam alimentos em Florianópolis SC, Brasil. **Revista Ciências da Saúde**, v. 21, p. 27–31, 2002.

ORDÓÑEZ, J. A. et al. **Tecnologia de Alimentos: Alimentos de Origem Animal**. Porto Alegre: Artmed, 2005.

PERRY, K. S. P. Queijos: aspectos químicos, bioquímicos e microbiológicos. **Quim. Nova**, v. 27, n. 2, p. 293-300, 2004.

PICOLI, S.U. et al. Quantificação de coliformes, *Staphylococcus aureus* e mesófilos presentes em diferentes etapas da produção de queijos Frescal de leite de cabra em laticínios. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 26, n. 1, p. 64-69, 2006.

PONTAROLO, G. H. **Qualidade e inocuidade do Queijo Artesanal Serrano, do leite e da água utilizados na sua produção, em Santa Catarina**. 2014. 96 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Ciência Animal, Medicina Veterinária, Universidade do Estado de Santa Catarina, Lages, 2014. Disponível em:
<http://www.cav.udesc.br/arquivos/id_submenu/757/dissertacao_mca_giane_helenita_pontarolo.pdf>. Acesso em: 26 fev. 2018.

RIES, J. E.; LUZ, J. C. S.; WAGNER, S. A. **Projeto de qualificação e certificação do queijo serrano produzido nos Campos de Cima da Serra do Rio Grande do Sul: Relato parcial da experiência**. Agroecologia e Desenvolvimento Rural Sustentável, Porto Alegre, v. 5, n. 1, p.10-19, 2012. Disponível em:
<http://www.emater.tche.br/site/arquivos_pdf/teses/Rev-Agr_02-Rel-Exp.pdf>. Acesso em: 29 set. 2016.

SANTA CATARINA. **Decreto N° 1.238 de 19 de julho de 2017**: Regulamenta a Lei n° 17.003, de 2016, que dispões sobre a produção e comercialização do queijo artesanal serrano, no Estado de Santa Catarina. Florianópolis, SC, 2017. Disponível em: <<http://www.cidasc.sc.gov.br/inspecao/files/2012/08/Decreto-1238-2017-PDF-SCC-6258-2017.pdf>>. Acesso em: 11 abr. 2018.

SANTOS, M. V.; CORTINHAS, C. S. **Avaliação da qualidade microbiológica do leite cru**. 2010. Disponível em: <<https://www.milkpoint.com.br/colunas/marco-veiga-dos-santos/avaliacao-da-qualidade-microbiologica-do-leite-cru-61643n.aspx>>. Acesso em: 25 jan. 2018.

SHINOHARA, N. K. S. et al. *Salmonella* spp., importante agente patogênico veiculado em alimentos. **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 13, n. 5, p. 1675-83, 2008.

SLOW FOOD BRASIL. **Queijos artesanais de leite cru – diversidade, sabor e cultura**. 2012. Disponível em: <<https://www.slowfoodbrasil.com/textos/queijos-artesanais/521-queijos-artesanais-de-leite-cru-diversidade-sabor-e-cultura>>. Acesso em: 24 jan. 2018.

SILVA, N. da. et al. **Manual de métodos de análise microbiológica de alimento e água**. São Paulo: Varela, 2010.

SILVA, J. F. Q. et al. **Utilização de coliformes termotolerantes como indicadores higiênico-sanitários de queijo Prato comercializado em supermercados e feiras livres de Recife-PE**, 2011.

SILVA, G. A. V. da. **Avaliação das condições de obtenção do leite e da ação de sanificantes no tanque de expansão em uma propriedade leiteira no município de candeias /Bahia – estudo de caso**. 2006. 102 f. Dissertação (Mestrado em Alimentos, Nutrição e Saúde), Universidade Federal da Bahia, Salvador, 2006. Disponível em: <https://repositorio.ufba.br/ri/bitstream/ri/9550/1/Dissert%20Guilherme_seg.pdf>. Acesso em: 25 jan. 2018.

SOUZA, L. H. L. de. **A manipulação inadequada dos alimentos: fator de contaminação**. 2017. Disponível em: <http://www.aedb.br/seget/arquivos/artigos05/42_artigo_seget.pdf>. Acesso em: 01 fev. 2017.

TENREIRO, M. I. C. **Estudo Das Propriedades Físico-Químicas Do Queijo Serra Da Estrela**. 2014. 82 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Mestrado em Qualidade e Tecnologia Alimentar, Escola Superior Agrária de Viseu, Viseu, Portugal, 2014. Disponível em: <[http://repositorio.ipv.pt/bitstream/10400.19/3301/1/TENREIRO, Marlene Inês Caseiro_Estudo das propriedades físico-químicas do queijo Serra da Estrela.pdf](http://repositorio.ipv.pt/bitstream/10400.19/3301/1/TENREIRO,Marlene%20In%C3%AAsCaseiro_Estudo%20das%20propriedades%20f%C3%ADsico-qu%C3%ADmicas%20do%20queijo%20Serra%20da%20Estrela.pdf)>. Acesso em: 11 mar. 2018.

TORTORA, G.J.; FUNKE, B.R.; CASE, C.L. **Microbiologia**. 6.ed. Porto Alegre: Artmed, p. 827, 2000.

VÄLIMAA, A. L.; TILSALA-TIMISJÄRVI, A.; VIRTANEN, E. Rapid detection and identification methods for *Listeria monocytogenes* in the food chain—a review. **Food Control**, v. 55, p. 103-114, 2015.

VILJOEN, B.C. The interaction between yeasts and bacteria in dairy environments. **Int. J. Microbiol.**, v.69, p.37-44, 2001.

ZUNABOVIC, M.; DOMIG, K. J.; KNEIFEL, W. Practical relevance of methodologies for detecting and tracing of *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat foods and manufacture environments – A review. **Food Science and Technology**, v. 44, n. 2, p. 351-362, 2011.