

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO RIO GRANDE DO SUL
UNIDADE EM ENCANTADO
MESTRADO PROFISSIONAL EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS

JEFERSON ALOÍSIO STRÖHER

DO LEITE AO QUEIJO:

Atributos de qualidade e avaliação do processo de maturação do Queijo Artesanal Serrano

ENCANTADO

2022



uergs

Universidade Estadual do Rio Grande do Sul

PPGCTA

Programa de Pós-Graduação em
Ciência e Tecnologia de Alimentos

Catálogo de publicação na fonte (CIP)

S921d Ströher, Jeferson Aloísio

Do leite ao queijo: atributos de qualidade e avaliação do processo de maturação do Queijo Artesanal Serrano/ Jeferson Aloísio Ströher. – Encantado, 2022.

172 f.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual do Rio Grande do Sul, Mestrado Profissional em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Unidade em Encantado, 2022.

Orientadora: Prof.^a Dra. Rosiele Lappe Padilha

Coorientador: Prof. Dr. Voltaire Sant'Anna

1. Análises físico-químicas. 2. Análise metagenômica. 3. Análise proteômica. 4. Dissertação. I. Padilha, Rosiele Lappe. II. Sant'Anna, Voltaire. III. Universidade Estadual do Rio Grande do Sul, Mestrado Profissional em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Unidade em Encantado, 2022. IV. Título.

JEFERSON ALOÍSIO STRÖHER

DO LEITE AO QUEIJO:

Atributos de qualidade e avaliação do processo de maturação do Queijo Artesanal Serrano

Dissertação de Mestrado apresentada como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos da Universidade Estadual do Rio Grande do Sul. Linha de Pesquisa: Desenvolvimento e inovação de produtos e processos na indústria de alimentos.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Rosiele Lappe Padilha

Colaborador: Prof. Voltaire Sant'Anna

ENCANTADO

2022

JEFERSON ALOÍSIO STRÖHER

DO LEITE AO QUEIJO:

Atributos de qualidade e avaliação do processo de maturação do Queijo Artesanal Serrano

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO RIO GRANDE DO SUL
Mestrado Profissional em Ciência e Tecnologia de Alimentos

Data da aprovação: 12 de março de 2022

Banca Examinadora:

Dra. Neila Silvia Pereira dos Santos Richards
Universidade Federal de Santa Maria

Dr. Voltaire Sant'Anna
Universidade Estadual do Rio Grande do Sul

Dr. Wemerson de Castro Oliveira
Instituto Federal do Rio Grande do Sul

AGRADECIMENTOS

É difícil agradecer todas as pessoas que de algum modo fizeram ou fazem parte da minha vida, por isso primeiramente agradeço a todos de coração.

Agradeço aos meus pais, Silvia e Nelson, pela determinação e luta na minha formação. O meu muito obrigado mãe, por todos esses anos estar ao meu lado nos momentos bons e ruins. Mesmo não havendo a comunicação por palavras, com o teu olhar, tuas expressões e o toque de tuas mãos, o amor transborda e seguimos, por dias ainda melhores. Agradeço também à minha madrasta Anelise e a minha prima (irmã) Joseane e a todas as minhas tias (as quais são muitas).

Agradeço também à minha orientadora, Rosiele Lappe Padilha, e aos professores da UERGS, Voltaire Santanna e Magnólia Martins Erhardt, que com dedicação, presteza e competência conduzem sua profissão e me auxiliaram muito no desenvolvimento deste trabalho. É amiga professora Rosiele, lá se vão 12 anos de UERGS, doze anos de palavras de motivação e persistência e de amizade.

A todos os meus amigos do Leite, especialmente à Barbara Maurer, Edivani Schenkel, Nicole Maurer e ao amigo Charles Diedrich, obrigado pela contribuição nas análises do projeto e pelos chimarrões, cafés, tortas e risadas do dia a dia.

Agradeço também à propriedade que produziu e forneceu os queijos e o leite do experimento e a extensionista da EMATER, Lilian Ceolin pela escolha desta propriedade; espero auxiliar de alguma forma na produção desse produto tão nobre e essencial social, ambiental e economicamente para a região. Aos meus grandes amigos de longa data: Dani, Raul, Beto, Angélica, Bruna, Jéssica, Ed, Diego, Jeni e Rhafa o meu agradecimento por estes anos de amizade.

E finalmente agradeço a Deus, por proporcionar esses agradecimentos a todos que tornaram minha vida mais afetuosa, além de ter me dado uma família maravilhosa e amigos sinceros. Assim, lutar, conquistar, vencer e até mesmo cair e perder, e o principal, viver é o meu modo de agradecer sempre.

O meu muito obrigado a todos vocês.

“... Em primeiro lugar eu sempre coloco as vacas no canzil e vou buscar o café para tomar o Camargo... E depois que tomamos o Camargo, aí e começa a rotina do leite...”.

Produtor do Queijo Artesanal Serrano do experimento

RESUMO

O presente trabalho disserta sobre a qualidade do Queijo Artesanal Serrano (QAS) produzido nos Campos de Cima da Serra do Rio Grande do Sul (RS). Esse queijo, fabricado artesanalmente, é característico da região, fabricado a partir de leite cru. Ao longo de duzentos anos sofreu poucas alterações em sua produção, sendo que atividade de produção é de grande importância econômica, social e ambiental para a região. O objetivo deste trabalho foi avaliar a sua qualidade físico-química e microbiológica e identificar os micro-organismos presentes ao longo da maturação, por técnicas de proteômica e metagenômica, de um lote de queijo produzido por uma agroindústria inspecionada, ao longo de sua maturação (sessenta dias), em três diferentes temperaturas de maturação (5, 12,5 e 20 °C). Também foram avaliadas as Boas Práticas Agropecuárias (BPA) da propriedade e as Boas Práticas de Fabricação (BPF) da agroindústria, acompanhada ainda a ordenha dos animais e a fabricação de um lote de QAS. Da mesma forma foi coletado leite cru para a realização das análises físico-químicas e microbiológicas. As análises microbiológicas realizadas nos queijos foram a contagem de coliformes termotolerantes e coliformes totais, *Staphylococcus* Coagulase Positiva (SCP), Salmonella, Listeria, Escherichia coli e Enterotoxina estafilocócica, com base na metodologia oficial brasileira (BRASIL, 2019; BRASIL, 1996). Os queijos também foram analisados durante a sua maturação, através da técnica rDNA 16S e ITS (análise metagenômica), quanto a sua identificação bacteriana e fúngica, respectivamente). Nas condições ambientais estudadas, as temperaturas mais altas de maturação (12,5 e 20 °C), após 30 dias de maturação, mostrou ser a mais adequada, visto que as bactérias de origem alimentar atingiram uma população segura, atendendo à legislação brasileira. A maturação do QAS em temperaturas mais baixas (5 °C) mostrou-se inadequada, pois os micro-organismos patogênicos *Staphylococcus* coagulase positiva não foram inativados durante todo o período de maturação (60 dias), indicando a necessidade de revisão da atual regulamentação brasileira para queijos de leite cru. Desta forma, pode-se concluir que um controle de temperatura de maturação do QAS é de grande importância para que ele atinja aos padrões estabelecidos em seu RTIQ.

Palavras-chave: Queijo artesanal Serrano. Maturação. Análises físico-químicas. Análises Microbiológicas. Análise metagenômica. Análise proteômica.

ABSTRACT

This paper discusses the quality of the Artesanal Serrano Cheese (ASC) produced in Campos de Cima da Serra, Rio Grande do Sul (RS). This cheese, made by hand, is characteristic of the region, made from raw milk. For over two hundred years it has undergone few changes in its production, and the production activity is of great economic, social, and environmental importance for the region. The objective of this work was to evaluate its physical-chemical and microbiological quality and to identify the microorganisms present throughout maturation, by proteomics and metagenomics techniques, of a batch of cheese produced by an inspected agro-industry, throughout its maturation (sixty days), in three different maturation temperatures (5, 12.5 and 20 °C). The Good Agricultural Practices (GAP) of the property and the Good Manufacturing Practices (GMP) of the agroindustry were also evaluated, and the milking of the animals and the manufacturing of a batch of ASC were also monitored. Raw milk was also collected for physicochemical and microbiological analyses. The microbiological analyses performed on the cheeses were the count of thermotolerant coliforms and total coliforms, *Staphylococcus* Coagulase Positive (SCP), *Salmonella*, *Listeria*, *Escherichia coli* and *Staphylococcal Enterotoxin*, based on the official Brazilian methodology (BRASIL, 2019; BRASIL, 1996). The cheeses were also analyzed during their maturation, through the 16S rDNA and ITS (metagenomic analysis) technique, regarding their bacterial and fungal identification, respectively). In the environmental conditions studied, the highest maturation temperatures (12.5 and 20 °C), after 30 days of maturation, proved to be the most adequate, since the foodborne bacteria reached a safe population, meeting the Brazilian legislation. The maturation of the ASC at lower temperatures (5 °C) proved to be inadequate, since the pathogenic microorganisms *Staphylococcus* coagulase positive were not inactivated during the entire maturation period (60 days), indicating the need to review the current Brazilian regulation for raw milk cheeses. Thus, it can be concluded that a control of the aging temperature of the ASC is of great importance for it to reach the standards established in its RTIQ.

Keywords: Serrano artisanal cheese. Ripening. Physicochemical analysis. Microbiological Analysis. Metagenomics analysis. Proteomic analysis.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Parâmetros físico-químicos e microbiológicos do leite cru refrigerado.....	25
Tabela 2: Limites de contagem de micro-organismos para a produção e comercialização de queijos.....	27
Tabela 3: Itens do plano de qualificação de fornecedores de leite	43
Tabela 4: Avaliação das BPAs na propriedade estudada.	66
Tabela 5: Análises físico-químicas e microbiológicas em leite cru, considerando os seus limites mínimos e máximos, conforme a IN n.º 76.	68
Tabela 6: r-valores de correlação entre bactérias transmitidas por alimentos nos parâmetros físico-químicos do SAC e do queijo, durante a sua maturação.	96

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Área da indicação geográfica dos Campos de Cima da Serra (contorno amarelo).	22
Figura 2: Modelo de etiqueta para o IG/DO do QAS produzido nos Campos de Cima da Serra.	23
Figura 3: Fluxograma de condução do experimento com o leite cru (D:0) e com o QAS, ao longo de sua maturação.*	42
Figura 4: Fluxograma de produção do QAS.	54
Figura 5: Resfriamento do leite na propriedade.....	56
Figura 6: Filtragem do leite cru.	57
Figura 7: Aquecimento do leite.....	58
Figura 8: Adição de coalho no leite.	58
Figura 9: Aquecimento da coalhada.	59
Figura 10: Corte da massa.....	60
Figura 11: Dessoragem da massa.....	61
Figura 12: Salga da massa de queijo.....	62
Figura 13: Enformagem do queijo.	62
Figura 14: Prensagem do queijo.	63
Figura 15: Maturação dos queijos.....	64
Figura 16: Análise de umidade do QAS em diferentes temperaturas (5, 12,5 e 20°C), ao longo do tempo de maturação, considerando os seus limites máximo e mínimo, representados pelas barras em (36 e 45,9 g/100 g)	76
Figura 17: Aspecto visual dos queijos maturados no tempo D:60.....	78
Figura 18: Análise de atividade de água do QAS em diferentes temperaturas (5, 12,5 e 20 °C), ao longo do tempo de maturação.	79
Figura 19: Análise de gordura do QAS em diferentes temperaturas (5, 12,5 e 20°C), ao longo do tempo de maturação, considerando os seus limites máximo e mínimo representados pelas barras em (25 e 44,9 g/100 g).	80
Figura 20: Análise de pH do QAS em diferentes temperaturas (5, 12,5 e 20°C), ao longo do tempo de maturação.	81
Figura 21: Análise de acidez do QAS em diferentes temperaturas (5, 12,5 e 20 °C), ao longo do tempo de maturação.	83
Figura 22: Análise de cloreto de sódio (NaCl) do QAS em diferentes temperaturas (5, 12,5 e 20 °C), ao longo do tempo de maturação.	84
Figura 23: Análise da gordura no extrato seco do QAS em diferentes temperaturas (5, 12,5 e 20 °C), ao longo do tempo de maturação, considerando os seus limite máximo e mínimo, representados pela barra em (25 e 44,9 g/100 g)	86

Figura 24: Análise de Staphylococcus Coagulase Positiva do QAS em diferentes temperaturas (5, 12,5 e 20 °C), ao longo do tempo de maturação, considerando o seu limite máximo representado pela barra em (3 Log UFC/g).....	89
Figura 25: Análise de coliformes totais do QAS em diferentes temperaturas (5, 12,5 e 20 °C), ao longo do tempo de maturação, considerando o seu limite máximo na legislação representado pela barra em (2 Log UFC/g) de acordo com Brasil (1996) *.....	92
Figura 26: Análise de coliformes termotolerantes do QAS em diferentes temperaturas (5, 12,5 e 20 °C), ao longo do tempo de maturação, considerando o seu limite máximo representado pela barra em (3 Log UFC/g), de acordo com Brasil (1996).....	93
Figura 27: Taxonomia das espécies de BAL encontradas durante a maturação do QAS (exibição pela sua diversidade)*	100
Figura 28: Taxonomia das espécies de bactérias patogênicas encontradas durante a maturação do QAS (exibição pela sua diversidade) *	103
Figura 29: Taxonomia das espécies de fungos identificados durante a maturação do QAS (exibição pela sua diversidade).....	108
Figura 30: Classificação taxonômica do leite cru, através da técnica rDNA 16S.....	111

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1: Resultados do PLS para influência de parâmetros físico-químicos em coliformes termotolerantes (barras brancas), coliformes totais (barras pontilhadas) e <i>Staphylococcus</i> coagulase positiva (barras cinzas) crescimento populacional.	95
Gráfico 2: Taxonomia dos gêneros bacterianos (<i>reads</i>) identificados durante a maturação do QAS (exibição pela sua quantidade).	99
Gráfico 3: Taxonomia dos gêneros fúngicos (<i>reads</i>) identificados durante a maturação do QAS (exibição pela sua quantidade).	107

LISTA DE ABREVIACÕES

- AM: Aeróbios mesófilos
- BAL: Bactéria ácido láctica
- BPA: Boas Práticas agropecuárias
- et al.*: e outros
- E. coli: *Escherichia coli*
- BPF: Boas Práticas de Fabricação
- CCS: Contagem de células somáticas
- CIRAM: Centro de Informações de Recursos Ambientais
- CPP: Contagem padrão em placas
- DNA: *Deoxyribonucleic acid* - Ácido desoxirribonucleico
- DO: Denominação de origem
- DOP: Designação de Origem Protegida
- DTA: Doenças transmitidas por alimentos
- ECP: *Staphylococcus* coagulase positiva
- EMATER: Associação Riograndense de Empreendimentos de Assistência Técnica e Extensão Rural
- FAPROGAS: Associações de Produtores de Queijo Artesanal Serrano dos Campos de Cima da Serra do RS e SC
- IG: Indicação geográfica
- IN: Instrução Normativa
- MAPA: Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento
- MBPF: Manual de Boas Práticas de Fabricação
- NGS: *Next Generation Sequencing* – Sequenciamento de nova geração
- PCR: *Polymerase chain reaction* – Reação em cadeia da polimerase
- RS: Rio Grande do Sul
- RNA: *Ribonucleic acid* – Ácido ribonucleico
- RTIQ: Regulamentos Técnicos de Identidade e Qualidade
- SC: Santa Catarina
- SIM: Serviço de inspeção municipal
- SNG: Sólidos não gordurosos
- spp.: Espécies de um gênero
- ST: Sólidos totais

SUSAF: Sistema Unificado Estadual de Sanidade Agroindustrial
Familiar, Artesanal e de Pequeno Porte

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	14
2	REFERENCIAL BIBLIOGRÁFICO	17
2.1	QUEIJOS ARTESANAIS	17
2.2	O QUEIJO ARTESANAL SERRANO.....	17
2.2.1	Legislação para a produção do Queijo Artesanal Serrano.....	19
2.3	BPA	23
2.4	BPF.....	24
2.5	A PRODUÇÃO DE LEITE CRU REFRIGERADO	24
	25
2.5.1	Micro-organismos presentes no leite cru.....	26
2.6	QUALIDADE MICROBIOLÓGICA DE QUEIJOS	26
2.7	MÉTODOS DE IDENTIFICAÇÃO DE MICRO-ORGANISMOS PRESENTES EM ALIMENTOS.....	28
2.7.1	Sequenciamento de DNA	28
2.7.2	Técnica de Sequenciamento de nova geração (NGS)	29
2.7.3	Química NGS	29
2.7.4	Identificação de Bactérias - Genes e Regiões do Sequenciamento de DNA	30
2.7.5	Sequenciamento Illumina®	31
2.8	MATURAÇÃO DOS QUEIJOS	32
2.9	BACTÉRIAS ÁCIDO LÁTICAS	34
2.10	PRESENÇA FÚNGICA NOS QUEIJOS E NO LEITE	37
3	MATERIAIS E MÉTODOS	41
3.1	BOAS PRÁTICAS AGROPECUÁRIAS (BPA) NA PROPRIEDADE PRODUTORA DA MATÉRIA-PRIMA.....	42
3.2	BOAS PRÁTICAS DE FABRICAÇÃO (BPF) PARA A PRODUÇÃO DO LEITE E FABRICAÇÃO DO QAS	43
3.3	ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS E MICROBIOLÓGICAS DO LEITE CRU	44
3.3.1	Análise proteômica (MALDI-TOF-MS).....	44
3.3.2	Análise de resíduos de antibióticos	45
3.3.3	Análise físico-químicas do leite	45
3.4	ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS DOS QUEIJOS.....	46
3.4.1	Umidade	46
3.4.2	pH	46

3.4.3	Acidez titulável	47
3.4.4	Teor de gordura.....	47
3.4.5	Gordura no extrato seco (GES).....	48
3.4.6	Teor de Cloreto de sódio (NaCl)	48
3.4.7	Atividade de água (Aw).....	48
3.5	ANÁLISES MICROBIOLÓGICAS DOS QUEIJOS	49
3.5.1	Contagem da população de coliformes termotolerantes e totais.....	49
3.5.2	Pesquisa de <i>Staphylococcus coagulase positiva</i>	50
3.5.3	<i>Salmonella</i>	50
3.5.4	<i>Listeria monocytogenes</i>	50
3.5.5	<i>Escherichia coli</i>	51
3.5.6	Enterotoxinas estafilocócicas.....	51
3.6	SEQUENCIAMENTO DE NOVA GERAÇÃO (NGS), PARA A IDENTIFICAÇÃO DE BACTÉRIAS)	52
3.7	SEQUENCIAMENTO DE NOVA GERAÇÃO (NGS), PARA A IDENTIFICAÇÃO DE FUNGOS.....	53
3.8	ANÁLISES DOS DADOS.....	53
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	54
4.1	PRODUÇÃO DO QUEIJO ARTESANAL SERRANO.....	54
4.1.1	Ordenha do leite	54
4.1.2	Resfriamento do leite	55
4.1.3	Resfriamento do leite	55
4.1.4	Transporte do leite	56
4.1.5	Filtragem do leite.....	57
4.1.6	Aquecimento do leite.....	57
4.1.7	Coagulação.....	58
4.1.8	Descanso da massa	59
4.1.9	Aquecimento e agitação da coalhada.....	59
4.1.10	Corte da massa	59
4.1.11	Dessoragem	60
4.1.12	Salga	61
4.1.13	Enformagem	62
4.1.14	Prensa	63
4.1.15	Maturação.....	63
4.1.16	Embalagem e expedição.....	64
4.1.17	Transporte dos queijos.....	64

4.1.18 Comercialização	65
4.2 BPA	66
4.3 BPF	67
4.4 ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS DO LEITE	68
4.4.1 Acidez	68
4.4.2 Caseína	69
4.4.3 CCS	69
4.4.4 Cinzas	70
4.4.5 CPP	70
4.4.6 Densidade	71
4.4.7 Estabilidade ao alizarol	71
4.4.8 Gordura	71
4.4.9 Índice crioscópico	72
4.4.10 Lactose	72
4.4.11 pH	73
4.4.12 Proteína	73
4.4.13 Sólidos não gordurosos (SNG) e Sólidos totais (ST)	74
4.4.14 Ureia	74
4.4.15 Detecção de Antibióticos	75
4.5 ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS DO QUEIJO	76
4.5.1 Umidade	76
4.5.2 Atividade de água (Aw)	79
4.5.3 Gordura	80
4.5.4 pH	81
4.5.5 Acidez	82
4.5.6 Cloreto de sódio (NaCl)	84
4.5.7 Gordura no extrato seco (GES)	85
4.6 ANÁLISES MICROBIOLÓGICAS DOS QUEIJOS	87
4.6.1 <i>Listeria monocytogenes</i>	87
4.6.2 <i>Salmonella</i>	88
4.6.3 <i>Staphylococcus coagulase positiva</i>	88
4.6.4 Enterotoxinas estafilocócicas	90
4.6.5 <i>Escherichia coli (E. Coli)</i>	91
4.6.6 Coliformes totais e termotolerantes	91
4.7 CORRELAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA E MICROBIOLÓGICA DO QAS, DURANTE A SUA MATURAÇÃO	94

4.8 ANÁLISE METAGENÔMICA (NGS) (BACTÉRIAS)	97
4.9 TAXONOMIA DAS ESPÉCIES DE BAL DO QAS AO LONGO DE SUA MATURAÇÃO...99	
4.10 TAXONOMIA DAS ESPÉCIES DE BACTÉRIAS PATOGÊNICAS DO QAS, AO LONGO DE SUA MATURAÇÃO.....	103
4.11 ANÁLISE METAGENÔMICA (NGS) (FUNGOS).....	104
4.12 ANÁLISE METAGENÔMICA E PROTEÔMICA DO LEITE CRU.....	110
4.12.1 Análise metagenômica (NGS) (Bactérias) do leite.....	111
4.12.2 Análise proteômica do leite cru (MALDI-TOF-MS).....	112
5 CONSIDERAÇÕES FINAIS	115
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	117
ANEXO A - Avaliação da conformidade de propriedades produtoras de QAS quanto às suas condições de higiene em atendimento ao artigo n.º 12 (RS, 2018).....	150
ANEXO B - Avaliação da conformidade de propriedades produtoras de queijo artesanal de leite cru quanto a Lei Estadual do RS n.º 15.615 de 13/05/2021.....	151
ANEXO C - Taxonomia geral das bactérias identificadas no experimento com as suas respectivas abundâncias (<i>reads</i>) (reino-gênero), em diferentes temperaturas (5; 12,5 e 20 °C) ao longo de sua maturação.....	156
ANEXO D - Classificação biológica das bactéria ácido lácticas nas amostras de QAS em diferentes temperaturas (5; 12,5 e 20 °C) ao longo de sua maturação.....	159
ANEXO E: Classificação biológica das bactéria patogênicas nas amostras de QAS em diferentes temperaturas (5; 12,5 e 20 °C) ao longo de sua maturação.....	160
ANEXO F - Taxonomia geral dos fungos identificados no experimento com as suas respectivas abundâncias (<i>reads</i>) (reino-gênero), em diferentes temperaturas (5; 12,5 e 20 °C) ao longo de sua maturação.....	163
ANEXO G - Classificação biológica fúngica nas amostras de QAS em diferentes temperaturas (5; 12,5 e 20 °C) ao longo de sua maturação.....	165

1 INTRODUÇÃO

O Queijo Artesanal Serrano (QAS) é um dos queijos artesanais mais antigos do Rio Grande do Sul (RS) e do Brasil, com mais de 200 anos de história. Ele é produzido com leite cru de vacas de corte, criadas em sistema extensivo e alimentadas com pasto nativo, fabricado com receita de origem portuguesa (MATOS, 2013; CRUZ e MENASCHE, 2014) e, desde o século XIX, ele era transportado sobre o lombo de mulas, servindo de moeda de troca para a compra de mercadorias não produzidas nas propriedades rurais da região (MENASCHE, 2014). No estado do Rio Grande do Sul, a produção de QAS ocorre nas áreas de campos nativos dos municípios de André da Rocha, Bom Jesus, Cambará do Sul, Campestre da Serra, Capão Bonito do Sul, Caxias do Sul, Esmeralda, Ipê, Jaquirana, Lagoa Vermelha, Monte Alegre dos Campos, Muitos Capões, Pinhal da Serra, São Francisco de Paula, São José dos Ausentes e Vacaria (RS, 2018).

O QAS é muito apreciado e consumido no sul brasileiro, porém a sua microbiota e as suas características físico-químicas são desconhecidas. O queijo é feito sem cozimento, semiduro, possui um sabor forte, casca fina, uniforme e lisa com coloração macia amarelo-palha e possui olhaduras distribuídas irregularmente, consumido maturado por trinta dias somente (PRETO, 2018). A fabricação do QAS exige o cumprimento de Boas Práticas Agropecuárias (BPA) sendo atividades, procedimentos e ações adotadas na propriedade rural que interferem diretamente na qualidade do leite cru e, conseqüentemente, na qualidade dos queijos produzidos.

As BPA possuem o objetivo de garantir a saúde, o bem-estar e a segurança dos animais, do homem e do ambiente (SINDILEITE, 2020). Os queijos podem conter micro-organismos indesejáveis, caso as Boas Práticas Agropecuárias (BPA), Boas Práticas de Ordenha (BPO) e de Fabricação (BPF), não forem aplicadas corretamente pelo estabelecimento produtor, visto que o queijo é produzido com leite cru. A ocorrência de micro-organismos patogênicos nos queijos pode causar diversos problemas, incluindo surtos de toxinfecções alimentares (JAY, 2005). As BPF garantem a qualidade e a segurança alimentar dos alimentos produzidos, sendo que as condições de higiene para a fabricação do QAS são de suma importância e estão preconizados pelo Decreto n.º 54.199 (RS, 2018).

Para melhorar a qualidade do leite produzido no Brasil, o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) publicou a Instrução Normativa (IN) n.º 76 e a IN n.º 77

(BRASIL, 2018). A IN 76 apresenta o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade (RTIQ) do leite cru refrigerado e a IN 77 (BRASIL, 2018) menciona critérios para a obtenção de leite de qualidade. Algumas técnicas proteômicas, como a de MALDI-TOF MS, permite a reprodutibilidade de espectros e segundo Zhang et al. (2004), é um fator crítico para a identificação de bactérias por comparação de seus *Fingerprintings* de massas. Com essa metodologia, as bactérias podem ser identificadas por comparação de espectro de massas, com os de referência de cepas conhecidas, utilizando-se o processamento de dados por análise estatística multivariada, o que pode proporcionar o diagnóstico do patógeno causador da mastite com mais rapidez do que os métodos convencionais. Esta técnica é considerada vanguardista, na microbiologia humana, pois possibilita alta confiabilidade para a detecção de micro-organismos causadores de doenças (SEIBOLD *et al.*, 2010). Sendo que esta técnica vem contribuir com os resultados já estipulados pela legislação brasileira para o leite cru refrigerado, segundo a Instrução Normativa n.º 76, de 26 de novembro de 2018 (BRASIL, 2018), pois, pode detectar espécies causadoras de mastite no leite cru.

A legislação brasileira cita que os queijos fabricados a partir de leite cru devem possuir, no mínimo, sessenta dias de maturação para a inativação de micro-organismos patogênicos e o tempo mínimo de maturação dos queijos pode ser alterado após a realização de estudos científicos conclusivos, sobre a inocuidade do produto ou em casos previstos em RTIQ. Os micro-organismos, como as bactérias, leveduras, bolores e fungos, podem estar presentes no queijo durante a maturação. Estes podem atuar positivamente ou negativa, modificando aromas que, às vezes, proporcionam perda de qualidade ou riscos à saúde pública, ou contribuindo para o processo de maturação do queijo, sendo um período de cura, conservação e perda de umidade. O período de maturação é aquele em que se desencadeiam modificações bioquímicas como proteólises e lipólises, que transformam a massa do queijo em diferentes e variadas texturas, aromas e sabores (FOX *et al.*, 1998).

A avaliação da diversidade bacteriana e fúngica na maturação dos queijos é de suma importância para um controle de qualidade preventivo e eficaz, sendo que a identificação destes micro-organismos ajuda a entender, medir e aplicar ações corretivas nesse processo (PARANHOS, 2019). Por isso, a aplicação do sequenciamento de rDNA para a identificação de micro-organismos presentes durante a maturação dos queijos é muito relevante aos pequenos produtores de QAS da região dos Campos de Cima da Serra-RS, pois serão compreendidos os diferentes grupos de micro-organismos que estão presentes nos queijos que geram as transformações citadas acima.

Assim, a maturação é um processo importante na produção de QAS, pois constitui uma sequência de eventos bioquímicos e microbiológicos, mediados pelo fluxo metabólico dos níveis primários e das culturas adjuntas. O objetivo geral deste trabalho é avaliar a qualidade físico-química, microbiológica e a identificação de micro-organismos do Queijo Artesanal Serrano (QAS) produzidos na região dos Campos de Cima da Serra, no RS.

Dessa forma, este trabalho visou avaliar a diversidade bacteriana e fúngica presentes no processo de maturação do QAS, utilizando técnicas de sequenciamento de rDNA para identificar os grupos taxonômicos encontrados durante sessenta dias de maturação em três temperaturas diferentes, alinhando com a realização de análises físico-químicas e microbiológicas tradicionais do queijo e do leite, de uma propriedade dos Campos de Cima da Serra-RS. Para atingir o objetivo geral do presente trabalho, foram desenvolvidos os seguintes objetivos específicos:.

- Avaliação das Boas Práticas Agropecuárias (BPA) e de Boas Práticas de Fabricação (BPF) da propriedade produtora do leite cru e do Queijo Artesanal Serrano;
- Avaliação das características físico-químicas, microbiológicas e dos resíduos de antibióticos do leite cru e/ou refrigerado da propriedade;
- Avaliar as características físico-químicas e microbiológicas do Queijo Artesanal Serrano produzido, durante sessenta dias de armazenamento, em diferentes temperaturas (5, 12,5 e 20 °C), nos intervalos de tempos de 0, 15, 30, 45 e 60 dias;
- Identificar e quantificar a diversidade microbiológica do leite cru e do QAS por seu sequenciamento de rDNA de bactérias e fungos nos intervalos de tempos de 0, 15, 30, 45 e 60 dias, em temperaturas de maturação (5, 12,5 e 20 °C);
- Propor as condições mais adequadas de maturação do QAS ao longo de sessenta dias de maturação.

2 REFERENCIAL BIBLIOGRÁFICO

2.1 QUEIJOS ARTESANAIS

A origem da produção de queijos artesanais é desconhecida. Bachman *et al.*, (2011), citam que o leite cru era utilizado na produção de queijos, sendo fermentado pelas bactérias presentes naturalmente no leite e, após esta fermentação, a caseína coagulada era separada do soro, e o queijo era moldado, prensado e salgado (BACHMANN *et al.*, 2011).

Em países europeus, o queijo a partir de leite cru é tradicionalmente aceito. A Europa, por exemplo, possui tradição na produção de queijos artesanais a partir de leite cru, e alguns países se destacam nessa produção, tais como a Suíça, França, Itália e alguns já possuem o registro de Designação de Origem Protegida (DOP) (MONTEL *et al.*, 2014).

Murphy *et al.* (2016) relatam haver muitos estudos no Brasil, quanto à qualidade dos queijos artesanais produzidos, sendo que esta produção é fundamental para as regiões produtoras, pela grande importância econômica e social. Dessa forma, a padronização de sua produção visa o melhoramento da qualidade final dos produtos.

2.2 O QUEIJO ARTESANAL SERRANO

O queijo artesanal Serrano (QAS) é o produto maturado, fabricado em micro queijaria, localizada na propriedade de origem do leite, a partir de leite de animais sadios, cru, integral e recém-ordenhado, que se obtém por coagulação enzimática, com a utilização de coalhos industriais, e segundo a tradição histórica e cultural da região delimitada, como produtora no Estado do RS. Entende-se por queijo maturado aquele que sofreu as transformações bioquímicas e físicas necessárias à obtenção das características típicas do queijo. O QAS é classificado como semigordo e de média umidade conforme o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade (RTIQ) para queijos (Portaria 146, de 11 de março de 1996). Sendo permitido somente os seguintes ingredientes para a sua fabricação: leite cru integral, coalho industrial e cloreto de sódio (sal).

Para Ambrosini *et al.*, (2008), a comercialização do QAS pode representar de 10 a 60% dos recursos financeiros nas propriedades e possui uma grande importância econômica, social e ambiental (AMBROSINI, 2009). Devido à produção do QAS ser elaborado com o leite de

vacas de corte e que se alimentam com pastagem dos campos nativos, torna-se interessante para o produtor, a preservação do ambiente que fornece o leite para a sua produção. Quanto a produção de QAS no estado do RS, esta é realizada nos Campos de Cima da Serra (PACHOUD *et al.*, 2017). Essa região é encontrada no Planalto Sul-Brasileiro, especialmente nos estados do RS e em Santa Catarina (SC).

A composição da matéria-prima implica na qualidade do produto final e vários fatores podem influenciar na composição e qualidade do leite, entre eles, o manejo e a dieta oferecida ao animal durante o ano (LACOSTE, 2014). Por isso, a diversidade botânica de uma pastagem é considerada fator determinante para à produção de um queijo de qualidade, pois fornece altas concentrações de ácidos graxos e antioxidantes essenciais à saúde humana (MOLONEY, 2008). A tradição e o “saber-fazer” é secular na fabricação do QAS sem sofrer grandes modificações, sendo que o gado de corte que produz esse tipo de queijo foi introduzido pelos padres jesuítas para a alimentação das reduções jesuítas nos anos 1700 (FLORES, 2003) e após a sua expulsão do Brasil, no século XVIII, a região foi marcada pelas rotas de tropeiros entre o Rio Grande do Sul e São Paulo.

O tropeirismo povoou a região através da doação de Sesmaria, por doações de grandes áreas de terras na região. Enquanto o tropeirismo regional, iniciou pela vinda dos imigrantes europeus não ibéricos, e durante esse período, intensificou as trocas comerciais. Os agregados dos estabelecimentos latifundiários conseguiram adquirir o seu próprio gado e suas glebas de terras, desenvolvendo, assim, a agricultura familiar da região, e após algumas gerações, o tamanho das propriedades foi diminuindo. Foi quando o QAS se tornou uma grande fonte de renda para as famílias, sendo utilizado como moeda de troca por alguns alimentos que a região não produzia, tais como o sal, açúcar, farinha, etc. (KRONE, 2009).

Ries *et al.* (2012) relatam que a região dos Campos de Cima da Serra-RS possui cerca 1.500 produtores de QAS e sua produção é estimada em 700 toneladas ao ano (AMBROSINI, 2007). As cidades de Bom Jesus, Caxias do Sul, Cambará do Sul, Jaquirana, São Francisco de Paula e São José dos Ausentes são as responsáveis pela maior parte da produção gaúcha, e segundo Pachoud *et al.* (2017), este número talvez seja ainda maior, devido à informalidade destas propriedades. A produção no inverno é menor que no verão (8,8 e 9,2 litros/animal, respectivamente), em virtude da escassez de pastos, devido ao clima da região. Apesar disso, o valor pago do QAS sofre inversão, sendo mais alto no inverno, devido à falta na oferta do produto, e conforme Pachoud (2017), a sua comercialização é realizada a conhecidos e turistas diretamente nas propriedades ou por intermediários que revendem em centros urbanos maiores.

2.2.1 Legislação para a produção do Queijo Artesanal Serrano

Para a produção do QAS no RS, existem alguns regulamentos que os produtores devem seguir, sendo descritos a seguir:

2.2.1.1 Instrução Normativa (IN) SEAGRI n.º 7

A instrução normativa (IN), de 9 de dezembro de 2014 (RS, 2014), aprova o RTIQ do Queijo Serrano. Ela apresenta algumas exigências de qualidade que os queijos devem possuir em sua fabricação, a qual determina critérios microscópicos, macroscópicos, físico-químicos e microbiológicos. Quanto aos critérios macroscópicos, os queijos não devem conter impurezas ou substâncias estranhas de qualquer natureza; quanto aos microscópicos, não deverão apresentar substâncias microscópicas estranhas, de qualquer natureza.

Conforme aos seus padrões microbiológicos, o QAS deve atender o critério para o queijo de médio teor de umidade (pois ele é maturado por no mínimo sessenta dias). Ele também deve possuir consistência elástica, tendendo à untuosidade (gorduroso), conforme o conteúdo de umidade, matéria gorda, grau de maturação, textura macia, compacta e cor amarelado ou amarelo-palha uniforme.

O seu sabor deve ser característico, podendo ser ligeiramente ácido, picante ou salgado, segundo o conteúdo de cloreto de sódio e o seu grau de maturação. Seu odor também deve ser característico e agradável e deve possuir a sua crosta uniforme, de espessura média, lisa e sem trincas e pode possuir/ou não pequenas olhaduras, sendo elas mecânicas, bem distribuídas, podendo variar o seu peso e formato.

Quanto aos padrões físico-químicos, o QAS deve obedecer à Portaria n.º 146 do MAPA (BRASIL, 1996) e corresponde ao queijo de média umidade (umidade entre 36,0 e 45,9%) e teor de gordura no extrato seco (GES) entre 25,0 a 44,9%. Já para os demais padrões de qualidade, o RTIQ do QAS explica que os contaminantes orgânicos e inorgânicos não devem estar presentes em quantidades superiores aos limites estabelecidos pelo regulamento específico.

2.2.1.2 Decreto n.º 54.199

O decreto n.º 54.199, de 24 de agosto de 2018 (RS, 2018), regulamenta a Lei n.º 14.973, de 29 de dezembro de 2016 e dispõe sobre a produção e a comercialização do QAS. Ele destaca as condições sanitárias que o local de ordenha deve possuir, a obrigatoriedade quanto aos treinamentos dos responsáveis pela ordenha e produção dos queijos.

Esse decreto cita que os estabelecimentos devem possuir os manuais de BPA e BPF, respectivamente, implantação de Procedimentos Operacionais Padronizados (POP's), Manuais de Boas Práticas de Fabricação (MBPF) e de BPA. Também devem possuir análises periódicas em seu autocontrole, quanto às amostras do leite do rebanho, conforme IN n.º 77 (MAPA, 2018), para monitoramento da Contagem Padrão em Placas (CPP), da Contagem de Células Somáticas (CCS), de resíduos químicos e de análise físico-química.

2.2.1.3 Lei n.º 13.860 (BRASIL, 2019)

A Lei n.º 13.860 dispõe sobre a elaboração e a comercialização de queijos artesanais. Ela considera artesanal o queijo elaborado por métodos tradicionais, com vinculação e valorização territorial, regional ou cultural, conforme protocolo de elaboração específico estabelecido para cada tipo e variedade, e com emprego de boas práticas agropecuárias e de fabricação. A elaboração de queijos artesanais, a partir de leite cru, fica restrita à queijaria situada em estabelecimento rural certificado como livre de tuberculose e brucelose, segundo as normas do Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e da Tuberculose Animal (PNCEBT), ou controlado para brucelose e tuberculose por órgão estadual de defesa sanitária animal.

Alguns requisitos devem ser obedecidos, tais como: participar de programa de controle de mastite com realização de exames para detecção de mastite clínica e subclínica, inclusive, com análise periódica do leite da propriedade; a implantação de programa de boas práticas agropecuárias na produção leiteira; o controle e o monitoramento da potabilidade da água utilizada nas atividades relacionadas à ordenha e a implantação da rastreabilidade de produtos produzidos pela agroindústria. A agroindústria também deve possuir e implantar o programa de boas práticas de fabricação (BPF), a fim de garantir a qualidade sanitária e a conformidade dos produtos alimentícios com os regulamentos técnicos, inclusive, o monitoramento da saúde dos

manipuladores de queijo e do transporte do produto até o entreposto, caso a queijaria estiver a ele vinculada; controlar e monitorar a potabilidade da água utilizada nos processos de elaboração do queijo artesanal e implementar a rastreabilidade de produtos.

2.2.1.4 IN n.º 3 (BRASIL, 2021)

A Instrução Normativa SEAPDR n.º 03, de 11 de fevereiro de 2021, estabelece a documentação e o fluxo para as agroindústrias produtoras de QAS que tenham interesse em obter o Selo Arte. Para a sua obtenção, elas deverão apresentar alguns documentos, tais como: declaração que o produto de origem animal é produzido artesanalmente, emitida pelo médico veterinário responsável pelo Serviço de Inspeção Municipal (SIM), acompanhada de análises laboratoriais, como: análises físico-química e microbiológica do produto; análises laboratoriais físico-química e microbiológica da água do estabelecimento; manual de BPF implantado e o manual de BPA da produção própria, título de registro no SIM, assinado pelo médico veterinário responsável por esse serviço, acompanhado de memorial descritivo do produto artesanal; rótulo aprovado pelo SIM; declaração de tempo de maturação, conforme Decreto n.º 9.013, de 29 de março de 2017. (BRASIL, 2017) e Instrução Normativa n.º 30 de 7 de agosto de 2013 (BRASIL, 2013), e for fim, a declaração de responsabilidade do produtor.

2.2.1.5 Lei n.º 15.615 (RS, 2021)

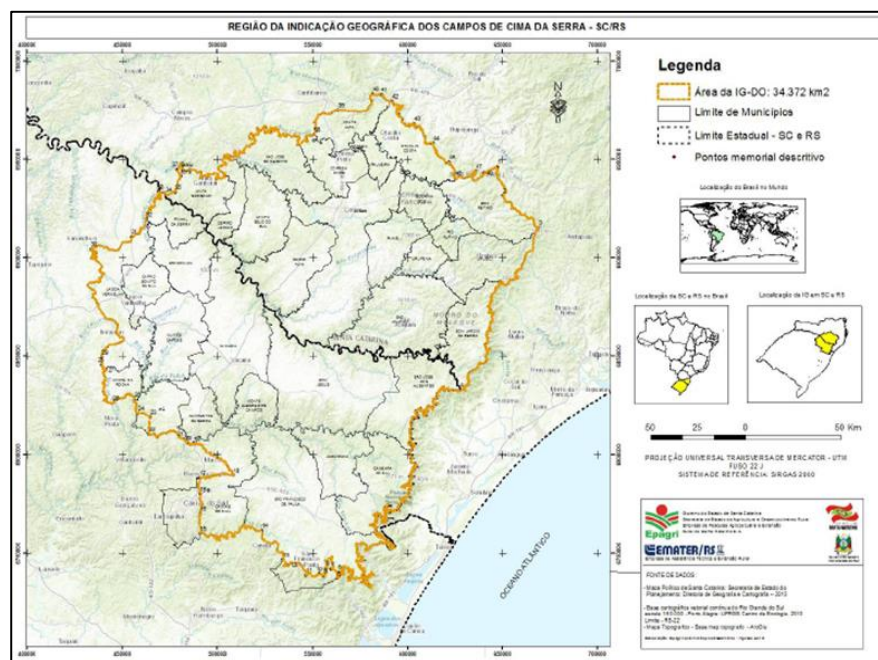
A Lei n.º 15.615, de 13 de maio de 2021, dispõe sobre a produção e a comercialização de queijos artesanais fabricados com leite cru no estado do RS. Ela esclarece as disposições da produção, comercialização e da fiscalização desses produtos. Segundo essa legislação, o queijo artesanal deve ser produzido na propriedade rural, a partir do leite cru, com a aplicação de métodos tradicionais e a vinculação de denominação (território) de origem, conforme RTIQ para cada variedade de queijo produzido e devem atender condições sanitárias mínimas de higiene.

2.2.1.6 Denominação de origem do QAS

A Denominação de Origem do Queijo Artesanal Serrano regulamenta o uso da indicação geográfica (IG) na modalidade Denominação de Origem (DO) campos de Cima da Serra para o queijo artesanal Serrano. O direito de uso da identidade da IG/DO é exclusivo do produtor de QAS, estabelecido na área de abrangência dos Campos de Cima da Serra dos estados de SC e RS, conforme características regionais, segundo o seu regulamento (Figura 1).

Uma série de exigências deve ser obedecidas para a inclusão de IG/DO, para a produção do QAS, tais como a área geográfica que delimita a região. Ela deve ser localizada entre as coordenadas geográficas de latitudes $27^{\circ}13'15,683''S$ e $29^{\circ}33'22,896''S$ e as longitudes $51^{\circ}42'20,251''W$ e $49^{\circ}13'49,955''W$, com área total de $34.372,7 \text{ km}^2$ e compreende as regiões do Planalto Sul Catarinense e Nordeste do RS.

Figura 1: Área da indicação geográfica dos Campos de Cima da Serra (contorno amarelo).



Fonte: Faprogas, (2019).

Quanto ao clima da região, ele é temperado e úmido com verão ameno; a temperatura média no mês mais frio abaixo de $18^{\circ}C$, com verões frescos, a temperatura média no mês mais quente, abaixo de $22^{\circ}C$ e sem estação seca definida. As precipitações de chuva variam anualmente entre 1.300 a 1.800 mm de chuva, com umidade do ar anual variando de 79 a 82%. Cerca de 5% dessa região encontra-se com uma altitude de 100 a 700 metros.

Quanto à hidrografia, a região compreende parte das nascentes dos rios Canoas e Pelotas, que correspondem aos principais formadores da extensa bacia do rio Uruguai. Ao sul, encontra-se a bacia do rio Taquari e Antas. Com relação aos corpos d'água, observa-se ainda a formação de áreas alagadas e turfeiras.

Sobre as pastagens naturais fornecidas aos animais, é recomendado o uso do aproveitamento da diversidade das pastagens naturais ou cultivadas. Pode-se, ainda, utilizar gramíneas e leguminosas exógenas. Também se recomenda a utilização das pastagens naturais, conforme a legislação ambiental vigente, visando a preservação das espécies de melhor valor forrageiro.

As raças autorizadas para a produção de leite para a fabricação de QAS constituem-se na totalidade das raças bovinas com aptidão para corte. Na Figura 2, pode-se verificar o modelo de etiqueta para IG/DO da Campos de Cima da Serra.

Figura 2: Modelo de etiqueta para o IG/DO do QAS produzido nos Campos de Cima da Serra.



Fonte: Faprogas, (2019).

2.3 BPA

A aplicação das BPAs nas propriedades rurais, objetiva a redução dos riscos de contaminação do leite cru e, conseqüentemente, dos produtos produzidos a partir desse leite. Os procedimentos adotados no atendimento às BPAs (BRASIL, 2018), conseguem reduzir a contaminação microbiana do leite. As BPA implementadas na execução do plano de qualificação de fornecedores de leite devem contemplar no mínimo 16 itens, conforme preconiza a n.º IN 77 (MAPA, 2018). As BPAs estão associadas ao processamento de derivados lácteos seguros e de qualidade, com respaldo à sustentabilidade ambiental e à possibilidade de

agregação de valor aos produtos, além de ser uma exigência dos consumidores e da legislação (EMBRAPA, 2005). A implantação correta dessas boas práticas na propriedade rural, assegura que o leite e seus derivados estejam adequados e nos parâmetros da legislação brasileira (BRASIL, 2018). Fernandes (2011), cita que a eficácia das ações das BPA depende do planejamento econômico da propriedade, sendo que devem ser realizadas melhorias quanto às pastagens, produção de silagem, aquisição de concentrados e investimentos em tecnologias de manejo e conservação do produto. Sendo assim, as áreas que devem ser observadas na implantação das BPA são: a saúde animal, higiene na ordenha, nutrição, bem-estar animal, meio ambiente e gestão socioeconômica (FAO e IDF, 2013).

2.4 BPF

As BPFs representam uma ferramenta de qualidade, que visa garantir produtos de qualidade ao consumidor e a sua adoção é um requisito para produção do QAS. Elas devem ser aplicadas desde a recepção do leite, processamento, até a sua expedição. Um programa de BPF é dividido nos seguintes itens: instalações industriais, pessoal, operações, controle de pragas, controle da matéria-prima, registros, documentação e rastreabilidade, entre outros (EMBRAPA, 2015). Além das questões que envolvem a qualidade dos alimentos, as BPF possibilitam um ambiente de trabalho mais eficiente, contribuindo para a eficácia do processo de produção. São necessárias para controlar possíveis fontes de contaminação cruzada e para garantir que o produto atenda às especificações de identidade e de qualidade. O Decreto n.º 54.199 de 24 de agosto de 2018 (RS, 2018) cita que os estabelecimentos produtores de QAS devem possuir o Manual de Boas Práticas de Fabricação e devem estar disponíveis para possíveis auditorias.

2.5 A PRODUÇÃO DE LEITE CRU REFRIGERADO

Conforme o Decreto n.º 9.013, de 29 de março de 2017, “entende-se por leite, sem outra especificação, o produto oriundo da ordenha completa e ininterrupta, em condições de higiene, de vacas sadias, bem alimentadas e descansadas”. O leite é uma combinação de diversos elementos sólidos em água que representam em média 12 a 13% do leite, além da água que comporta cerca de 87% do total. Entre lipídios (3,5% a 5,3%), carboidratos (4,7% a 5,2%), proteínas (3% a 4%), sais minerais e vitaminas (1%), suas distribuições e interações são

determinantes para a estrutura, propriedades funcionais e aptidão do leite para processamento (BRITO *et al.*, 2009).

O leite obtido na ordenha, seja ele manualmente ou mecânica, deve ser obtido com o máximo de higiene, tanto pessoal quanto no local para não haver alteração na composição. A falta de higiene na ordenha acarreta aumento de bactérias presentes no leite, sendo que entre as bactérias presentes, a maioria é dada pelos contaminantes e patogênicas, o que mais adiante afeta a qualidade do leite e seus derivados (TRONCO, 2008). Entre os micro-organismos existentes no leite se destacam os de características mesofílicas (30 a 35 °C), termofílicas (acima de 45 °C) e psicrotróficas (20 a 25 °C) (SAEKI *et al.*, 2010).

Assim, Araújo *et al.* (2015), descrevem que a qualidade do leite é definida por parâmetros de características sensoriais, físico-químicas, baixa contagem bacteriana, ausência de micro-organismos patogênicos, baixa contagem de células somáticas (CCS), ausência de conservantes químicos e resíduos de antibióticos, abaixo dos limites máximos estabelecidos pela legislação. O controle de qualidade do leite é de grande importância na produção de derivados lácteos, sendo que um leite de qualidade garante uma maior vida útil dos produtos fabricados. Para conter a contaminação do leite cru refrigerado, o MAPA publicou a IN n° 76, sobre os padrões que o leite cru refrigerado deve possuir (Tabela 1).

Tabela 1: Parâmetros físico-químicos e microbiológicos do leite cru refrigerado

Características físico-químicas	Padrão
Gordura	Mín. 3,0 g/100 g
Lactose anidra	Mín. 4,3 g/100 g
Sólidos não gordurosos	Mín. 8,4 g/100 g
Sólidos totais	Mín. 11,4 g/100 g
Acidez titulável	Entre 0,14 e 0,18 g de ácido láctico/100 mL
Estabilidade ao alizarol	Mín. 72% v/v
Densidade relativa a 15 °C/ 15 °C	Entre 1,028 e 1,034 g/mL
Índice crioscópico	Entre -0,530 °H e -0,555°H equivalentes a -0,512 °C e a -0,536 °C, respectivamente.

Fonte: Adaptado (BRASIL, 2018).

2.5.1 Micro-organismos presentes no leite cru

A rapidez e o grau de resfriamento do leite após a ordenha têm um impacto significativo no conteúdo microbiano. O resfriamento de até 4 °C retarda o crescimento da maioria dos microrganismos, porém, bactérias psicotróficas, tais como *Pseudomonas* e *Acinetobacter*, continuam a crescer lentamente (QUIGLEY *et al.*, 2013). Algumas dessas bactérias podem produzir enzimas resistentes ao calor, que não são inativadas por tratamentos de alta temperatura, portanto, podem continuar causando deterioração, mesmo após a morte do microrganismo produtor (VON NEUBECK *et al.*, 2015).

2.6 QUALIDADE MICROBIOLÓGICA DE QUEIJOS

O Regulamento Industrial de Inspeção Sanitária de Produtos de Origem Animal (RIISPOA) descreve que se entende por queijo, o produto lácteo, seja ele fresco ou maturado, obtido pela separação parcial do soro do leite ou leite reconstituído (integral, semidesnatado ou desnatado) ou de soros lácteos, por meio da coagulação proteica, através da ação do coalho e/ou enzimas específicas que são produzidas por determinados micro-organismos e de ácidos orgânicos (isolados ou combinados), podendo ter ou não adição de substâncias alimentícias, como especiarias, condimentos ou aditivos, que obedçam aos padrões higiênicos-sanitários, não apresentando risco à saúde humana (BRASIL, 2017).

Nesse sentido, o queijo pode ser classificado com base no tipo de leite utilizado, processo de fabricação, teor de gordura, tipo de fermentação e sua microbiota, que a partir de uma diversidade de reações bioquímicas, pode ser conservado e melhorado (CODEX ALIMENTARIUS COMMISSION, 1978). Diversificado em texturas, aromas, sabores e formas, o queijo faz parte da dieta regular dos consumidores (SANTIAGO-LÓPEZ *et al.*, 2018). Os queijos elaborados com leite cru contêm compostos voláteis em abundantes resultantes da fermentação do leite pela sua microbiota natural (OCAK, JAVIDIPOUR & TUNCTURK, 2015). A pasteurização é uma importante medida de segurança para os produtos lácteos, eliminando, assim, os patógenos do leite cru. O processo possui restrições devido à eliminação das bactérias microbianas nativas, população responsável pelo componente aromatizante na maioria dos queijos tradicionais fabricados, a partir de leite cru (GOBBETTI *et al.*, 2018).

As espécies de micro-organismos presentes no leite e sua relação com o processo de produção, a interação simbiótica de bactérias do ácido láctico, a cinética de desenvolvimento, espécies e biótipos envolvidos na caracterização de diferentes queijos, são também determinantes para um produto de qualidade. Culturas iniciais são adicionadas ao processo, favorecendo a inibição de possíveis patógenos durante a maturação (DE DEA LINDNER *et al.*, 2008; FOX *et al.*, 2017). O queijo é um dos produtos mais suscetíveis às contaminações microbianas, em razão dos vários processos envolvidos na sua fabricação, como a coagulação do leite, corte do coágulo, dessoragem, enformagem, salga e maturação (FURTADO, 2005).

Portanto, no ano de 2019 entrou em vigor a Instrução Normativa n.º 60, de 23 de dezembro de 2019 (BRASIL, 2019) que estabelece as listas de padrões microbiológicos para alimentos prontos para oferta ao consumidor e se aplica de maneira complementar à RDC (Resolução da Diretoria Colegiada) n.º 331. Essa instrução dispõe sobre os padrões microbiológicos para os alimentos e sua aplicação. Essa legislação é essencial para a verificação da qualidade dos queijos fabricados com leite cru de todas as espécies mamíferas leiteiras, pois certifica um alimento seguro e apto para o consumo humano e que as boas práticas agropecuárias e as boas práticas de fabricação tenham sido atendidas. Na Tabela 2, pode-se verificar os padrões microbiológicos do QAS, conforme padrões da legislação brasileira na Portaria 146, de 11 de março de 1996 e RDC n.º 331, de 23 de dezembro de 2019.

Tabela 2: Limites de contagem de micro-organismos para a produção e comercialização de queijos

Categoria Específica	Micro-organismo/Toxina/Metabólito	Legislação	Límite máximo
Queijos	<i>Listeria monocytogenes</i> (25 g)	BRASIL, (2019)	Ausente
	<i>Salmonella</i> /25g (25 g)		Ausente
	Estafilococos coagulase positiva/g (UFC/g)		10 ³
	Enterotoxinas estafilocócicas (ng/g)		Ausente
	<i>Escherichia coli</i> /g, para queijos com umidade abaixo de 46% (UFC/g)		10 ²
	<i>Escherichia coli</i> /g, para queijos com umidade igual ou acima de 46% (UFC/g)		10 ³
	Coliformes totais (30 °C) (UFC/g)		5x10 ³
	Coliformes termotolerantes (45 °C) (NMP/g)		BRASIL, (1996)

Fonte: Adaptado (BRASIL, 1996; BRASIL, 2019).

2.7 MÉTODOS DE IDENTIFICAÇÃO DE MICRO-ORGANISMOS PRESENTES EM ALIMENTOS

Os métodos microbiológicos tradicionais adotados pelos órgãos regulamentadores para a identificação e quantificação de bactérias patogênicas causadoras de doenças alimentares são focados em métodos de cultivo dependentes e, muitas vezes, o seu resultado é demorado e trabalhoso, pois possuem muitas etapas, tais como o seu enriquecimento, confirmações bioquímicas e sorológicas (RODRIGUEZ-LÁZARO *et al.*, 2007; LEE *et al.*, 2015).

Segundo Kaushik *et al.* (2013) esses métodos de cultivo (dependentes) podem não detectar células de crescimento lento, ou em seu estado viável, mas não cultivável (*viable but non-culturable*) (VBNC), e segundo DU *et al.* (2007), eles são um risco para a saúde humana, em função de não serem detectadas pelo método de contagem em meio de cultura (UFC), ou esse resultado pode ser subestimado e/ou se todas essas bactérias estiverem nesse estado, o resultado pode ser um falso negativo.

O estado VBNC dos micro-organismos é considerado um mecanismo de defesa quando eles se encontram em ambientes de estresse, podendo ser capazes de se manter nesses locais, como células vegetativas com baixo metabolismo, e quando são encontrados nesse estado, elas não são detectadas por técnicas de cultivo tradicionais. Contudo, quando as condições ambientais voltam a estar favoráveis, os micro-organismos voltam ao seu estado metabólico ativo (HEIM *et al.*, 2002; LI *et al.*, 2014).

Portanto, alguns métodos mais eficazes e rápidos têm se tornado relevantes para a indústria de alimentos, como o caso da utilização de métodos de cultivo independentes, os quais atuam por meio do estudo do DNA ou RNA dos micro-organismos para diferentes tipos de alimentos.

Cocolin *et al.* (2013), por exemplo, mencionam que uma das técnicas aplicadas para a identificação desses micro-organismos são baseadas na Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), bem como pelos métodos de sequenciamento do DNA, que possibilitam identificar diferentes genomas bacterianos contidos em uma mesma matriz alimentar (ALBERTS *et al.*, 2017; JAGADEESAN *et al.*, 2018). Porém, um aspecto negativo dessa técnica é ela possuir a limitação de não diferenciar entre células viáveis e não viáveis.

2.7.1 Sequenciamento de DNA

Em um pedaço de DNA, o processo de sequenciamento determina a sequência de nucleotídeos (A, T, C e G). Este processo iniciou-se em 1977, através do sequenciamento de Sanger, o que facilitou a detecção de bases individuais e a variação do DNA no nível de nucleotídeo único (SANGER, 1977).

No ano de 2005, o Sequenciamento de Nova Geração (NGS) foi introduzido nas pesquisas e nos diagnósticos de DNA, e muitas plataformas de sequenciamento foram lançadas no mercado, usando diferentes metodologias de sequenciamento e ferramentas computacionais para a análise da bioinformática e da interpretação dos dados de NGS (SANGER, 1977; REUTER; 2015; KULSKI; 2016; NIGAM, 2018).

2.7.2 Técnica de Sequenciamento de nova geração (NGS)

O sequenciamento de DNA evoluiu bastante desde a cromatografia bidimensional nos anos 70, com o advento do método de terminação da cadeia de Sanger, os cientistas obtiveram a capacidade de reduzir a quantidade de DNA de forma confiável e reproduzível. Posteriormente, a Applied Biosystems lançou os primeiros instrumentos de sequenciamento automatizados, baseados em eletroforese capilar (CE), o AB370 em 1987 e o AB3730xl, em 1998, instrumentos que se tornaram os principais pilares dos projetos Human Genome liderados pelos NIH e pela Celera (COLLINS, 2003).

A técnica de sequenciamento massivo de leitura curta foi uma abordagem fundamentalmente diferente da capacidade de sequenciamento evolucionada que lançou a “próxima geração” da ciência do genoma. A partir desse momento, a saída de dados do NGS ultrapassou a lei de Moore, sendo que as técnicas de NGS são novas abordagens efetuadas em grande escala que aumentam a velocidade e diminuem os custos do sequenciamento (PARANHOS, 2019).

2.7.3 Química NGS

A tecnologia sequenciamento de nova geração (NGS) é muito similar ao sequenciamento CE (Capillary Electrophoresis). A DNA polimerase catalisa a incorporação de trifosfatos de desoxirribonucleotídeos (dNTPs) marcados fluorescentemente no DNA, durante o ciclo sequencial, a síntese de DNA e o ciclo. No ponto de incorporação, os nucleotídeos são identificados pela excitação do fluoróforo. A diferença é que, em vez de sequenciar um único

fragmento de DNA, a NGS estende esse processo através de milhões de fragmentos de uma forma maciçamente paralela. Conforme os dados de sequenciamento no mundo, 90% são gerados pelo sequenciamento da Illumina por síntese química (Sequenciamento por Síntese, SBS). O sistema oferece uma alta precisão, leituras livres de erros de alto rendimento e uma alta porcentagem de chamadas de base acima de Q30 (ILLUMINA, 2017; ROSS, 2013; NAKAZATO, 2013).

2.7.4 Identificação de Bactérias - Genes e Regiões do Sequenciamento de DNA

Desde já, o sequenciamento do gene 16S rRNA é de suma importância na taxonomia bacteriana para a determinação de grupos bacterianos, para a identificação de suas espécies (DOULGERAKI, 2012). O gene 16S rRNA tem regiões conservadas e variáveis e pode permitir o desenvolvimento de *primers* direcionados a todas as bactérias e regiões de abrangência com sequências específicas de espécies (ERCOLINI, 2004). O sequenciamento de rRNA ou outros genes conservados têm sido amplamente aplicados na identificação microbiana, sendo que os micro-organismos procariotos incluem principalmente rDNA 16S, 23S e 16S e 16S e 23S, em simultâneo, os do tipo eucariotos incluem principalmente 5S, 18S, 28S rRNA (26S para leveduras) e região espaçadora interna transcrita (ITR) (ZHANG *et al.*, 2018; HAN *et al.*, 1994).

O RNA ribossômico 16S (ou 16S rRNA) é o componente da subunidade pequena 30S de um ribossomo procarioto que se liga na sequência Shine-Dalgarno. Os genes que a codificam são denominados gene 16S rRNA sendo utilizados na reconstrução de filogenias, devido às baixas taxas de evolução dessa região do gene (WOESE; FOX, 1977). Nesse sentido, nos anos de 1980, um novo padrão para identificação de bactérias começou a ser desenvolvido, sendo mostrado que as relações filogenéticas de bactérias, e, de fato, todas as formas de vida, poderiam ser determinadas comparando parte estável do código genético (CLARRIDGE, 2004; WOESE *et al.*, 2000; WOESE *et al.*, 1987).

O gene 16S rRNA pode ser comparado não apenas entre todas as bactérias, mas também com o gene 16S rRNA de arqueobactérias e o gene 18S rRNA de eucariotos. E, o gene 16S rRNA podem ser medidos entre todas as bactérias, pois é universal (WOESE *et al.*, 2000), portanto, a comparação do gene 16S rRNA permite a diferenciação entre organismos do gênero em todos os principais filos de bactérias, além de classificar cepas em vários níveis, incluindo as espécies e o nível de subespécies. A sequência do gene 16S rRNA tem cerca de 1.550 pb de comprimento, sendo composto de regiões variáveis e conservadas. O gene é grande o suficiente,

com polimorfismos interespecíficos de Gene 16S rRNA, para fornecer dados diferenciados e validar medições estatísticas. *Primers* universais são, geralmente, escolhidos como complementares às regiões conservadas no início do gene e na região de 540 pb ou no final de toda sequência (cerca da região de 1.550 pb) e a sequência da região variável entre elas é usada para a taxonomia comparativa (CHEN *et al.*, 1989). As regiões mais utilizadas para identificação taxonômica de bactérias são as regiões, V3, V4 e V6 (ZHANG *et al.*, 2018).

O perfil de comunidades bacterianas independentes da cultura depende da amplificação e sequenciamento do gene 16s rRNA (PARANHOS, 2019). O gene 16S rRNA consiste em nove regiões hipervariáveis cercadas por regiões de sequência mais conservada. As estratégias de sequenciamento MiSeq baseadas no 16S rRNA mais amplamente utilizadas incluem uma abordagem *single* (CAPORASO, 2012) ou a recentemente desenvolvida de dupla indexação visando a região hipervariável V3-V4 do gene 16S rRNA (ZHANG *et al.*, 2018; KOZICH, 2013). O uso dessa abordagem permite o sequenciamento, usando *primers* de sequenciamento padrão Illumina HP10 e HP11 que permitem flexibilidade adicional de sequenciamento.

2.7.5 Sequenciamento Illumina®

Os fluxos de trabalho do Illumina® NGS incluem quatro etapas básicas: a primeira (A) é o preparo da biblioteca: a biblioteca de sequenciamento é preparada por fragmentação aleatória da amostra de DNA ou cDNA, seguida de ligação de adaptador de 5' e 3'. Alternativamente, “*tagmentation*” combina as reações de fragmentação e ligadura em uma única etapa que aumenta muito a eficiência do processo de preparação da biblioteca. Sendo que 9 fragmentos são ligados por um adaptador, depois PCR amplificado e purificado em gel (ILLUMINA, 2017). A segunda etapa (B) é a geração cluster, sendo que a biblioteca é carregada em uma célula de fluxo, onde os fragmentos são capturados em um gramado de oligos, ligados à superfície complementares aos adaptadores da biblioteca e cada um desses fragmentos é amplificado em *clusters* clones distintos, através da amplificação da ponte. Quando a geração do *cluster* é concluída, os modelos estão prontos para o sequenciamento (ILLUMINA, 2017).

A terceira etapa é o sequenciamento. A tecnologia Illumina SBS utiliza um método proprietário baseado em terminador reversível que detecta bases simples, como eles são incorporados em fitas de modelos de DNA. Como todos os quatro dNTPs reversíveis ligados ao terminador são presentes, durante cada ciclo de sequenciamento, a competição natural minimiza o viés de incorporação e reduz muito o erro bruto em taxas, em comparação com

outras tecnologias. O resultado é um sequenciamento base-por-base altamente preciso, que virtualmente elimina erros específicos de contexto de sequência, mesmo em regiões de sequência repetitiva e homopolímeros (ILLUMINA, 2017). A quarta etapa (etapa D) é a análise dos dados. Durante essa análise, os dados são alinhados e as leituras de sequências recém-identificadas são alinhadas a uma referência do genoma. Após esse alinhamento, muitas variações de análises são possíveis, como um *single nucleotide polymorphism* (SNP) ou identificação de deleção de inserção (indel), leitura de contagem para métodos de RNA, filogenética ou análise metagenômica, etc. (ILLUMINA, 2017).

2.8 MATURAÇÃO DOS QUEIJOS

O desenvolvimento do sabor do queijo é um processo influenciado principalmente pela composição do leite, culturas e enzimas presentes ou adicionadas, diferentes condições de fabricação e maturação empregadas (KHATTAB *et al.*, 2019). Algumas culturas iniciadoras são adicionadas ao processo de fabricação de queijo para favorecer a inibição de possíveis patógenos durante a maturação (FOX *et al.*, 2017). A maturação pode alterar significativamente as características e agregar valor aos queijos artesanais. Os queijos produzidos de leite cru são conhecidos como microbiologicamente inseguros, pois não há tratamento térmico aplicado para a destruição de bactérias patogênicas. A *Salmonella* spp., pode ser encontrada em queijos feitos a partir de leite cru e não sobrevive à pasteurização (VILLARRUEL-LÓPEZ *et al.*, 2016). A *Listeria monocytogenes* e *Staphylococcus aureus* são patógenos comuns transmitidos por alimentos crus e uma causa de infecções graves em humanos. A *L. monocytogenes* sobrevive e cresce em condições aeróbicas e anaeróbicas, limitada em pH 4,0, temperatura baixa e embalagens a vácuo (BELLIO, *et al.*, 2016). No entanto, elas também podem ser introduzidas no queijo, como contaminantes após a pasteurização, se o processo não for adequadamente controlado, permitindo a presença dessas bactérias em queijos oriundos de leite pasteurizado ou cru.

A maturação deve ser realizada por, no mínimo, sessenta dias com a sua temperatura superior a 5 °C, em local ventilado e seco, porém esse período mínimo de maturação pode ser reduzido, se houver o atendimento quanto à Instrução Normativa N.º 30 de 7 de agosto de 2013 (BRASIL, 2013), ou outro regulamento que estabeleça condições para a produção de queijos artesanais. A necessidade de sessenta dias de maturação para queijos fabricados a partir de leite cru, ocorre para haver total inativação da microbiota patogênica dos queijos e depende

de vários fatores, tais como o tipo de queijo, espécies microbianas e número inicial de colônias presentes na massa do queijo. Os sessenta dias de maturação podem reduzir as contagens de coliformes totais e *Staphylococcus aureus*, mas não são considerados uma solução para a inativação total de patógenos (YOON *et al.*, 2016). Desse modo, amostras de QAS com 63 dias de maturação, ainda apresentavam contagens de patógenos acima da legislação (MELO *et al.*, 2013), demonstrando que nem mesmo a maturação conseguiu solucionar problemas de contaminações, devido a um processo de produção com baixa qualidade higiênico sanitária. Por esse motivo, o leite cru deve apresentar baixas concentrações de micro-organismos e boa qualidade, conforme estudos realizados por Martins (2006) e Dores (2007), sendo cruciais para estabelecer tempos de maturação reduzidos em queijo Minas artesanal.

O processo de maturação do queijo é um período de cura e perda de sua umidade. Esse período desencadeia modificações bioquímicas, como proteólise e lipólise, transformando um queijo de massa dura e firme, em diferentes e variadas texturas, aromas e sabores (ARENAS *et al.*, 2015). A etapa de maturação de queijos ocorre pela presença de um ecossistema complexo, formado por bactérias, bolores e leveduras que sofrem interações antagonistas. Além disso, cooperam em processos enzimáticos e metabólicos, sendo responsáveis por alterações no produto que, sozinhos, não conseguiriam alcançar (ARFI *et al.*, 2004). Além da microbiota autóctone, fatores tecnológicos e ambientais também podem afetar a microbiota de queijos, durante a maturação (VAN HOORDE *et al.*, 2010).

No início da maturação, quando o pH ainda está elevado, bactérias do grupo dos coliformes competem com as bactérias ácido lácticas (BAL), 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, e podem até desaparecer. Presume-se que o mesmo ocorra com os demais micro-organismos indesejáveis presentes no queijo, visto que, que a maioria deles é sensível à acidez e baixa atividade de água (ORDÓÑEZ *et al.*, 2005). As principais alterações bioquímicas relacionadas à maturação envolvem catabolismo da lactose residual, citrato, lipólise e proteólise, seguidas por desaminação, descarboxilação e dessulfurização de aminoácidos, β -oxidação de ácidos graxos e catabolismo do ácido láctico. A caseína forma cadeias polipeptídicas catalisadas pelas proteinases e peptidases, originando aminoácidos de cadeia ramificada e aromáticos que sofrem degradação em compostos orgânicos voláteis, através da descarboxilação e da desaminação, originando aminas biogênicas (relacionadas aos aromas desagradáveis), ésteres e aldeídos. A metionina origina compostos de enxofre, sendo absorvidos por algumas cepas de *L. lactis*. A

lactose residual é degradada pelas bactérias *starter* em lactato e oxidada pelas NSLAB em acetato, o citrato é transformado em acetato e diacetil (confere sabor amanteigado), butanona e butanodiol (KHATTAB *et al.*, 2019).

A microbiota fermentadora é formada, inicialmente, por bactérias ácido lácticas do gênero *Lactococcus*, acidificadoras, convertendo rapidamente a lactose em ácido láctico. Essas bactérias crescem em pH entre 6,0 e 6,5 e são sensíveis ao sal, por isto, a sua presença é reduzida durante o processo de maturação, à medida que o pH diminui e a concentração do sal aumenta (BRUNO *et al.*, 2009; OLIVEIRA, 2014). Com o avançar do tempo de maturação, as bactérias dominantes são do gênero *Lactobacillus*, mais resistentes ao sal e intolerantes ao meio ácido (OLIVEIRA, 2014). O sabor e o aroma dos queijos estão relacionados a essas bactérias, pois elas conferem a textura e outras características desejáveis, uma vez que produzem uma grande diversidade de enzimas glicolíticas, lipolíticas e proteolíticas, que estão envolvidas na transformação de nutrientes fundamentais em compostos desejáveis (DE SOUZA MOTTA, 2015).

Variáveis ambientais exercem efeitos diretos sobre os queijos em maturação. As enzimas são catalisadores por excelência e tem seu efeito potencializado sob maiores temperaturas. Logo, a soma de ambos os fatores, além de influenciar diretamente a velocidade de maturação de queijos, proporciona variações na viabilidade de crescimento de diferentes micro-organismos (COELHO *et al.*, 2008). A maturação dos queijos é realizada, na sua maioria, no interior de câmaras, onde tanto a temperatura como a umidade são controladas. O tempo varia de acordo com o tipo de produto, podendo oscilar entre algumas semanas, e leva até meses, sendo que a maturação em baixas temperaturas (5-13 °C) por meses e, às vezes, anos, para atingir o sabor e os atributos sensoriais desejáveis, permite a ação de micro-organismos e enzimas presentes no queijo, que atuam sobre os substratos da coalhada, de maneira a expressar as características do queijo através do microambiente da coalhada (pH do queijo, atividade da água, teor de sal e temperatura) (FOX & STEPANIAK, 1993; FOX & WALLACE, 1997).

A tendência na maturação é a redução progressiva dos micro-organismos presentes nos alimentos, devido aos processos que ocorrem, como acidificação do meio, redução da atividade de água (A_w) e competição com bactérias ácido lácticas (ORDÓÑEZ *et al.*, 2005).

2.9 BACTÉRIAS ÁCIDO LÁCTICAS

As bactérias ácido lácticas (BAL) podem ser definidas como um grupo de cocos e bastonetes gram-positivos, catalase negativa, não esporuladas, aeróbias, microaerófilas ou anaeróbicas facultativas e produzem ácido láctico, como o principal produto final durante a fermentação de carboidratos. Elas fazem parte da microbiota natural do leite e desempenham um papel determinante no processo de fabricação de queijos elaborados a partir de leite cru. A biodiversidade desses micro-organismos está relacionada com as condições de produção do leite, a região, o clima, a alimentação do rebanho, acarretando microbiotas variáveis de produto para produto, mas que proporcionam aos queijos, características particulares de região para região (ARENAS *et al.*, 2015; LECLERCQ-PERLAT *et al.*, 2015; SALES, 2015). Algumas bactérias deteriorantes produzem como deterioração típica, gás, limosidade e/ou líquido esbranquiçado (BJÖRKROTH *et al.*, 1998).

A sua classificação, em diferentes grupos, baseia-se na sua morfologia, no modo de fermentação da glicose, do crescimento a diferentes temperaturas, na adaptação a ambientes ricos em nutrientes para produzirem ácido láctico, na habilidade de crescer em elevadas concentrações de sal (NaCl) e a capacidade de apresentarem tolerância a meios ácidos ou alcalinos (LAHTINEN *et al.*, 2012).

As BAL estão compreendidas pelo reino Bacteria, filo Firmicutes e classe Bacilli e ordem Lactobacillales, sendo essa subdividida em 6 famílias: *Aerococcaceae*, *Carnobacteriaceae*, *Enterococcaceae*, *Lactobacillaceae*, *Leuconostocaceae* e *Streptococcaceae*. Dentre os principais gêneros do grupo das bactérias lácticas estão *Lactobacillus*, *Carnobacterium*, *Aerococcus*, *Pediococcus*, *Tetragenococcus*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Weissella*, *Enterococcus*, *Lactococcus*, *Streptococcus* e *Vagococcus* (LAHTINEN, 2012). O gênero *Bifidobacterium* é historicamente considerado pertencente ao grupo das BAL. Embora as espécies de *Bifidobacterium* se encaixem na descrição geral, elas são filogeneticamente mais relacionadas ao grupo Actinomycetaceae de bactérias gram-positivas.

O sistema de classificação ao nível de gênero divide os micro-organismos, primeiramente, segundo a morfologia, em bastonetes (*Lactobacillus* e *Carnobacterium*) e cocos (todos os outros gêneros). A outra característica importante utilizada na diferenciação de gêneros de BAL é o modo de fermentação da glicose, sob condições normais (fatores de crescimento, como os aminoácidos, vitaminas e precursores de ácidos nucleicos, e limitada capacidade de avaliação de oxigênio). Nessas condições, as BALs podem ser divididas em dois grupos: bactérias heterofermentativas (*Leuconostocs*, *Oenococcus*, *Wiesellas*, e um subgrupo de *Lactobacillus*) capazes de produzir não só ácido láctico, mas etanol/ácido acético e dióxido

de carbono, e as homofermentativas (os outros gêneros), capazes de converter quase que exclusivamente a lactose em ácido láctico (HOLZAPFEL *et al.*, 2018).

O leite pode conter bactérias patogênicas, as mais frequentemente encontradas são: *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes* e *Salmonella spp.* A presença de *Staphylococcus spp.* em queijos artesanais é bastante comum e se deve pela fabricação dos queijos artesanais ser caracterizada pela manipulação direta pelos produtores, o que aumenta o risco de transferência de *Staphylococcus spp.* para os queijos através de utensílios, superfícies dos equipamentos e dos funcionários, pois esse gênero é encontrado na pele e mucosas de animais e humanos (BASANISI *et al.*, 2016).

As BALs são denominadas em função de sua preferência em utilizar lactose como fonte de carbono, transformando o açúcar em ácido láctico, sendo este responsável pela acidificação “espontânea” do leite (RAPACCI *et al.*, 1997). Elas foram definidas inicialmente como grupo de micro-organismos com capacidade de coagular ou de fermentar o leite. São fastidiosas (produzem ácido láctico) e estão presentes em ambientes nutricionalmente ricos em matéria orgânica, são anaeróbias, anaeróbias facultativas e microaerofílicas. Elas são basicamente mesófilas, capazes de crescer num intervalo de 5 a 45 °C, com a maioria sendo destruída pelo aquecimento a 70 °C. A multiplicação de alguns destes micro-organismos é acompanhada pela liberação de enzimas proteolíticas capazes de degradar a caseína. Podem ser classificadas conforme a temperatura de crescimento em termofílicas, que crescem a uma temperatura ótima de 42 °C, e as mesófilas por volta de 30 °C (FOX *et al.*, 2000). As bactérias ácido lácticas empregam as vias homo ou heterofermentativas. A via homofermentativa tem no ácido láctico seu produto primário, a partir da fermentação da glucose, enquanto pela via heterofermentativa são produzidos ácido láctico, CO₂, ácido acético e etanol (KLEEREBEZEM *et al.*, 2003; CARR *et al.*, 2002).

As bactérias heterofermentativas, muitas vezes, contribuem com a caracterização do aroma, textura, valor nutritivo, e para a vida de prateleira mais prolongada, quando comparados os produtos fermentados em relação às suas matérias-primas (LEROY *et al.*, 2004). Na sua utilização em alimentos, busca-se sua habilidade em produzir compostos flavorizantes, muito mais do que pela sua habilidade acidificante (CARR *et al.*, 2002). As BALs também contribuem para a extensão da vida útil de alimentos de maneira geral, causada pela degradação dos carboidratos presentes na matéria-prima, diminuindo o pH e, assim, torna o meio inóspito para a maioria dos micro-organismos deterioradores e patogênicos. No entanto, esse acúmulo de ácidos modifica as propriedades reológicas e organolépticas do produto, num processo

complementado pela produção e, em alguns casos, pela secreção de enzimas hidrolíticas, principalmente proteinases e peptidases e ainda, embora em menor quantidade, de lipases e esterases (MADERA *et al.*, 2003). As bactérias ácido lácticas exercem função enzimática proteolítica para satisfazer sua demanda por diferentes aminoácidos para seu crescimento.

São inerentes da matéria-prima (leite) e desempenham um papel primordial no processo de fermentação do mesmo, além de produzir substâncias capazes de combater patógenos, conhecida como atividade antagonista das BALs. Essa característica é atribuída ao crescimento competitivo em relação a outros micro-organismos, potencializado pelos efeitos inibitórios dos seus metabólitos (MORAES, 2011). Essas bactérias compõem o principal grupo de micro-organismos gram-positivos, produtores de bacteriocinas (MORAES, 2011). São desejáveis e amplamente utilizadas na indústria de alimentos, pois apresentam diferente perfil de sensibilidade a proteases, que interferem em sua atividade no alimento e garantem degradação ao ser ingerida, com exceção de espécies *Bifidobacterium*, capazes de passarem pela digestão e chegar ilesas ao intestino (MORAES, 2011).

Elas compreendem a 13 gêneros: *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Lactosphaera*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Pediococcus*, *Paralactobacillus*, *Streptococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus* e *Weissella*, sendo considerados ainda, os gêneros: *Aerococcus*, *Alloiococcus*, *Dolosigranulum*, *Globicatella* e *Melissococcus* (SILVA, 2016). Contudo, os gêneros *Lactobacillus* e *Enterococcus*, são mais comumente utilizados como probióticos (MENDES *et al.*, 2014).

2.10 PRESENÇA FÚNGICA NOS QUEIJOS E NO LEITE

Os fungos são micro-organismos eucarióticos uni ou multicelulares, com muitas espécies de importância clínica e tecnológica (KUPFER *et al.*, 1997), e estão divididos em bolores ou mofos, gêneros multicelulares, de aspecto filamentoso e em leveduras, gêneros unicelulares, de aspecto mucoso (PITT *et al.*, 2009). No que lhe concerne, os bolores se desenvolvem em diversas matrizes alimentares, tais como o leite (ROCHA, 2004) e também são micro-organismos que auxiliam na produção do sabor, aroma e textura final em alguns queijos, por exemplo, no Camembert e o Roquefort (HYMERY *et al.*, 2014).

De modo geral, a presença de bolores nos queijos é indesejável, pois pode alterar a sua aparência, o que pode causar problemas econômicos e sensoriais, sendo que os metabólitos produzidos podem trazer risco à saúde do consumidor (ROBINSON, 1987). A presença de bolores durante a maturação dos queijos é uma grande preocupação (TANIWAKI *et al.*, 1991), sendo que o seu crescimento pode desencadear a proteólise na casca dos queijos semiduros com o aparecimento de manchas de cores variadas, alterando o seu sabor (ROCHA, 2004).

Essas alterações são resultados da produção enzimática dos bolores durante seu desenvolvimento, das quais se destacam as lipases, proteases e carboidrases (FILTENBORG *et al.*, 1996). Entretanto, os bolores e leveduras, estão naturalmente presentes no leite cru e, conseqüentemente, nos queijos artesanais produzidos a partir desta matéria-prima (JODRAL *et al.*, 1993), porém quando há a contaminação destes micro-organismos, ela pode ocorrer das seguintes formas: pelo ambiente de produção, utensílios e as prateleiras na maturação, pelo ar, água, salmoura e pelo leite (JAY, 2005).

Os gêneros fúngicos mais comuns em salas de maturação são: *Alternaria* spp., *Aspergillus* spp., *Monilia* spp., *Mucor* spp. e *Penicillium* spp. (ROBINSON, 1987; VARNAM *et al.*, 1995), dos quais o segundo e último podem produzir toxinas (PITT *et al.*, 2009). O crescimento fúngico nos queijos é influenciado por diversos fatores, tais como: pH, umidade, A_w , temperatura de maturação dos queijos e a concentração de sal, bem como um ambiente rico em nutrientes (ROCHA, 2014). Enquanto grande parte dos micro-organismos tem seu ótimo de multiplicação no pH em torno de 7, os bolores se desenvolvem melhor na faixa de pH entre 1,5 e 11 (JAY, 2005).

Apesar do risco à saúde, a presença de bolores nos queijos não é tão estudada quanto a contaminação bacteriana, principalmente em queijos artesanais, que não possuem muito controle sobre sua produção. O gênero *Penicillium* é, com os *Aspergillus* spp. e *Fusarium* spp., os fungos filamentosos de maior importância econômica, por provocarem deterioração em alimentos, porém é o que possui mais espécies e maior variação de habitat, sendo saprófitas oportunistas e pouco exigentes, nutricionalmente.

As leveduras possuem cerca de 1–5 μm de diâmetro e 5-30 μm de comprimento e possuem formas variadas, com uma membrana citoplásmica lipoprotéica, pela qual são feitas as trocas com o ambiente, e parede rígida constituída, principalmente, pelos sacarídeos manana e glucana, proteínas e lipídeos. Elas se reproduzem vegetativamente por células únicas, que brotam ou se dividem por fissão, sendo que esse tipo de reprodução favorece o rápido crescimento desse organismo. Leveduras possuem propriedades muito diversas entre si, agrupadas em dois grupos, os ascomicetos e os basidiomicetos, de acordo com seu tipo de

esporos. Diferentemente dos bolores, as leveduras possuem rotas metabólicas limitadas, demandando uma maior exigência nutricional, sendo os alimentos, dessa forma, um substrato ideal, por serem ricos em carboidratos, minerais e vitaminas. A presença deste microrganismo no alimento, dificilmente causa deterioração. Em grande parte, a sua presença é benéfica para a construção de sabor do produto (PITT *et al.*, 2009).

As modificações nos alimentos causados pelos fungos, muitas vezes, promovem uma condição favorável ao crescimento bacteriano, isto ocorre quando o ácido láctico do meio é metabolizado, aumentando o pH próximo à superfície do queijo, sendo que o rompimento de leveduras libera vitaminas e aminoácidos para o meio, que também favorecem a proliferação de bactérias ácido-láticas, responsáveis pela formação dos precursores de aroma (JAKOBSEN *et al.*, 1996). As leveduras são micro-organismos eucariotos, que contém um núcleo identificável e a maioria delas contém quitina, responsável por sua estrutura rígida (FOX *et al.*, 2000). Elas não são micro-organismos que exigem nutricionalmente e, comparando com as bactérias, são maiores e crescem mais lentamente; assim, as leveduras não competem com bactérias. No entanto, as leveduras crescem bem em ambientes acidificados, onde as bactérias podem crescer em pouca quantidade, sendo que o pH baixo do queijo recém-fabricado é parcialmente seletivo para o seu crescimento contra bactérias.

Os queijos artesanais possuem uma variedade diversificada de espécies de leveduras, principalmente pertencentes aos gêneros *Candida*, *Clavisporalus*, *Cryptococcus*, *Debaryomyces*, *Geotrichum*, *Issatchenkia*, *Kazachstania*, *Kluyveromyces*, *Kodemaesa*, *Pichia*, *Rhodotorula*, *Saccharomyces*, *Saturnispora*, *Torulasporea*, *Trichosporon*, *Yarrowia* e *Zygosaccharomyces* (BINTSIS, 2021). Os queijos fabricados a partir de leite cru, possuem uma microbiota importante presente no leite, que irá interferir na qualidade dos queijos finais (MONTEL *et al.*, 2014).

Para o crescimento de leveduras no interior do queijo, alguns requisitos devem estar presentes, como a relação à disponibilidade de oxigênio (sendo que leveduras estritamente aeróbicas irão sobreviver, porém, elas não crescerão). Entretanto, apenas as leveduras capazes de fermentar a lactose residual e/ou a galactose, conseguirão crescer no interior de um queijo (FRÖHLICH-WYDER *et al.*, 2018). A microbiota externa dos queijos pode suportar a presença de leveduras, bactérias e fungos filamentosos. Essas leveduras podem ser anaeróbicas ou aeróbicas (FRÖHLICH-WYDER *et al.*, 2003), e podem povoar a superfície dos queijos, conseguindo crescer em valores baixos de pH. A maioria das espécies de leveduras crescem em pH baixos (2,0 – 2,5), entretanto, elas crescem melhor na faixa de pH entre 4,7–7,0. Quanto a sua temperatura ideal, elas são encontradas na faixa entre 20 – 30 °C, mas muitas delas também

se desenvolvem em temperaturas mais amenas (2 a 10 °C). Algumas espécies também são tolerantes à baixa atividade de água dos queijos maturados e possuem uma faixa mínima de crescimento de A_w , entre 0,85-0,92. O mesmo ocorre com as tolerantes ao sal, e sobrevivem às concentrações de NaCl de até 20 – 24% (MONNET *et al.*, 2014). A superfície dos queijos fornece o habitat para o crescimento de leveduras, pois possui alguns substratos, como o ácido láctico e compostos nitrogenados, emergindo da glicólise e proteólise pelas bactérias ácido lácticas (FRÖHLICH-WYDER *et al.*, 2018).

As leveduras presentes no leite cru estão, geralmente, na faixa e 10^1 – 10^3 UFC/mL, (LAVOIE *et al.*, 2012) e os gêneros mais identificados incluem: *Candida*, *Cryptococcus*, *Debaryomyces*, *Geotrichum*, *Kluyveromyces*, *Trichosporon*, *Pichia* e *Rhodotorula* spp. (DELAVENNE *et al.*, 2011). *Candida rugosa*, *G. candidum*, *Torulaspota delbrueckii* e *Yarrowia lipolytica* foram espécies comuns de levedura encontradas no leite cru (BOUTROU *et al.*, 2005; BÜCHEL *et al.*, 2011). Büchel *et al.* (2011), também identificaram as seguintes espécies de leveduras no leite, como *G. candidum*, *Issatchenkia occidentalis*, *Issatchenkia orientalis*, *Kluyveromyces marximus*, *Pichia anomala*, *Pichia fermentans* e *Trichosporon beigelii*.

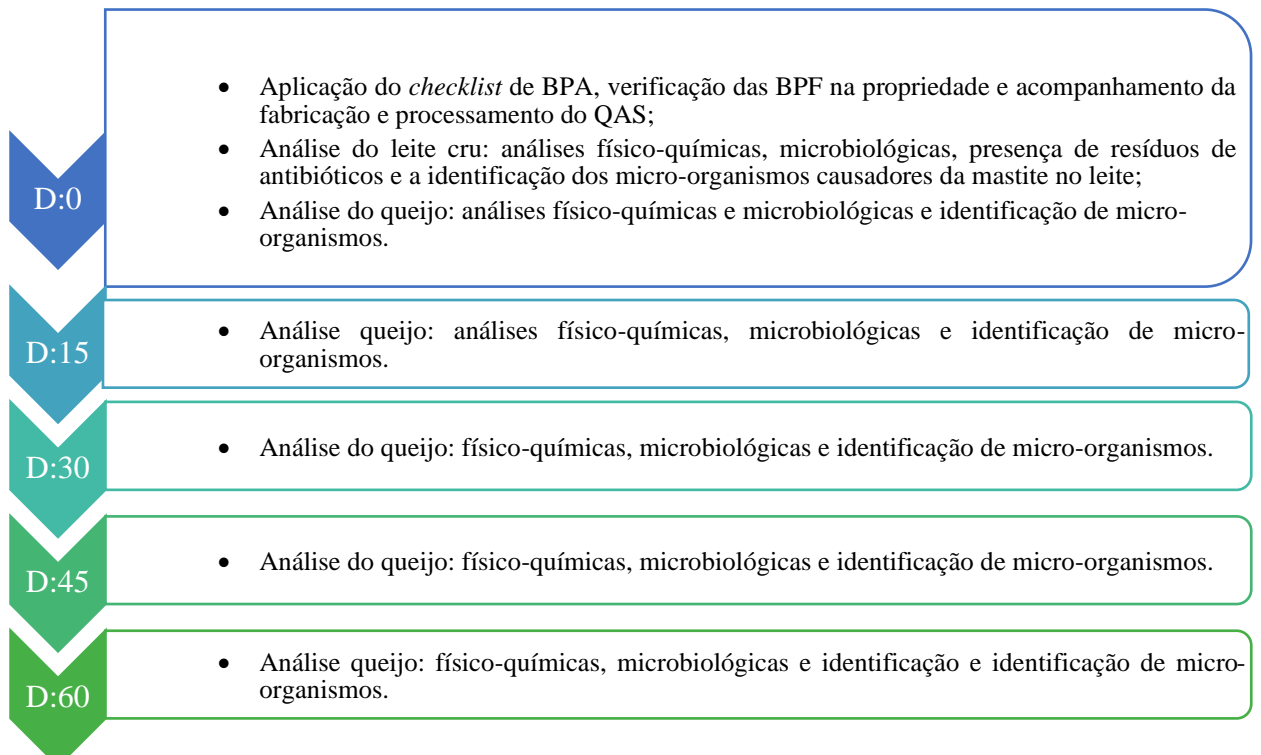
3 MATERIAIS E MÉTODOS

Esta seção descreve, detalhadamente, as etapas utilizadas para atingir os resultados pretendidos, a partir dos objetivos geral e específico deste estudo.

Para tanto, foram coletadas amostras de queijo Artesanal Serrano e de leite cru de uma propriedade formal certificada pelo Sistema Unificado Estadual de Sanidade Agroindustrial Familiar, Artesanal e de Pequeno Porte (SUSAF). A propriedade foi escolhida devido aos seus produtos estarem conforme os padrões da legislação brasileira para QAS e leite cru refrigerado no último ano de análise (2021), conforme apresentação de laudos oficiais disponibilizados *in loco* na agroindústria.

A metodologia de coleta e análises de QAS e de leite cru, assim como as demais verificações de qualidade estão descritas na Figura 3. Este experimento foi considerado determinante para a verificação da influência de diferentes temperaturas de maturação sobre os padrões físico-químicos e microbiológicos dos queijos Serranos durante a sua maturação. As amostras de QAS foram maturadas em ambiente controlado, em três diferentes temperaturas (5, 12,5 e 20 °C), onde nos intervalos (D:0; D:15; D:30; D:45; D: 60) foram realizadas as suas análises de qualidade (itens 3.5 e 3.6). O leite cru foi analisado conforme metodologia descrita abaixo (itens 3.3 e 3.4).

Figura 3: Fluxograma de condução do experimento com o leite cru (D:0) e com o QAS, ao longo de sua maturação.*



*Conforme a legenda: os identificadores (D:0; D:15; D:30; D:45; D:60) representam os intervalos em dias, em que as análises foram realizadas.

Fonte: Própria (2022).

3.1 BOAS PRÁTICAS AGROPECUÁRIAS (BPA) NA PROPRIEDADE PRODUTORA DA MATÉRIA-PRIMA

Foram verificados, na propriedade, os dezesseis itens que devem ser implementados na execução do plano de qualificação de fornecedores de leite (avaliação das BPA) (BRASIL, 2018), conforme a Tabela 3.

Tabela 3: Itens do plano de qualificação de fornecedores de leite

Item	Boas práticas agropecuárias a serem avaliadas	Item	Boas práticas agropecuárias a serem avaliadas
I	Manejo sanitário	IX	Manejo de ordenha e pós-ordenha
II	Manejo alimentar e armazenamento de alimentos	X	Adequação das instalações, equipamentos e utensílios para produção de leite
III	Qualidade da água	XI	Manejo de resíduos e tratamento de dejetos e efluentes
IV	Refrigeração e estocagem do leite	XII	Uso racional e estocagem de produtos químicos, agentes tóxicos e medicamentos veterinários
V	Higiene pessoal e saúde dos trabalhadores	XIII	Manutenção preventiva e calibragem de equipamentos
VI	Higiene de superfícies, equipamentos e instalações	XIV	Controle de fornecedores de insumos agrícolas e pecuários
VII	Controle integrado de pragas	XV	Fornecimento de material técnico, como manuais, cartilhas, entre outros
VIII	Capacitação dos trabalhadores	XVI	Adoção de práticas de manejo racional e de bem-estar animal

Fonte: adaptado (BRASIL, 2018).

3.2 BOAS PRÁTICAS DE FABRICAÇÃO (BPF) PARA A PRODUÇÃO DO LEITE E FABRICAÇÃO DO QAS

As BPFs da propriedade foram observadas através de *checklist* pré-estabelecidos, atendendo as seguintes legislações:

- Decreto 54.199 (RS, 2018), sendo verificados os procedimentos de ordenha, da fabricação, maturação e comercialização dos queijos, quanto às suas condições de higiene, conforme preconiza o artigo n.º 12 (ANEXO A);
- Lei n.º 15.615 (RS, 2021), sendo verificadas as condições de produção e comercialização do queijo artesanal fabricado com leite cru, no estado do Rio Grande do Sul (ANEXO B).

3.3 ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS E MICROBIOLÓGICAS DO LEITE CRU

A propriedade, foco deste estudo, forneceu 1 litro de leite recém-ordenhado de 8 animais em lactação para a realização das análises de detecção de resíduos de antibióticos, detecção de fraudes e para as análises físico-químicas. Além destas, mais 4 amostras de leite contendo 45 mL cada foram encaminhadas para a realização de análises físico-químicas e microbiológicas, em laboratório credenciado da Rede Brasileira de Qualidade do leite (RBQL), sendo refrigeradas imediatamente após a sua colheita (4 °C).

Também foram coletados leite cru em três frascos estéreis, contendo 45 mL de leite em cada frasco, para análise proteômica MALDI-TOF-MS no laboratório externo Qualileite, sendo que as amostras foram congeladas logo após a sua coleta e foram transportadas via transportadora sob temperatura de -10 °C, conforme metodologia, abaixo:

3.3.1 Análise proteômica (MALDI-TOF-MS)

A identificação microbiológica do leite foi realizada através da técnica de espectrometria de massas por ionização/dessorção a laser assistida por matriz-tempo de voo (MALDI-TOF) (Qualileite, Pirassununga, SP), para a identificação direta em amostras de leite (sem cultivo microbiológico) de bactérias causadoras de mastite, conforme descrito por Barcelos *et al.*, (2019).

Após 24 horas de incubação, os isolados microbianos que apresentaram crescimento positivo em ágar sangue foram selecionados para identificação microbiológica por MS, conforme descrito por Barcelos *et al.*, (2019). Para a extração da proteína ribossomal, uma colônia foi selecionada de cada isolado e aplicada em uma placa de aço, contendo 96 poços (MSP 96 Target polido aço, Bruker Daltonik) com um bastão de madeira estéril. Após a transferência de uma colônia para a placa de aço, um volume de 1,0 µL de ácido fórmico (70%) foi adicionado ao poço e submetido à secagem e à temperatura ambiente. Após a secagem, 1,0 µL de matriz de ácido α -ciano-4-hidroxicinâmico (HCCA; diluído em 50% de acetonitrila e 2,5% de ácido trifluoroacético) foi adicionado e deixado secar novamente em temperatura ambiente.

Para a calibração MALDI-TOF MS, foi utilizado 1,0 µL de solução de proteína padrão (padrão de teste bacteriano, BTS; Bruker), seguido pela adição de 1,0 µL de matriz HCCCA. As amostras de teste bacteriano foram analisadas no equipamento MicroFlex LT (BRUKER

DALTONIK), e os espectros de massa foram capturados pelo software FlexControl 3.4 (BRUKER DALTONIK) com um alvo na faixa de 2.000 a 20.000 m/z (razão massa-carga).

Os micro-organismos foram identificados usando o equipamento MALDI Biotyper Software 4.1.7 (BRUKER DALTONIK). Os resultados de identificação obtidos foram expressos por escores, de modo que escores $\geq 1,7$ foram considerados confiáveis pela identificação de gênero e escores $\geq 2,0$ foram considerados confiáveis para identificação ao nível de gênero e espécie (BARCELOS *et al.*, 2019).

3.3.2 Análise de resíduos de antibióticos

As análises de resíduos de antibióticos foram realizadas no mesmo dia da coleta do leite na propriedade, utilizando os testes comercializados na forma de kits da marca Bioeasy®, (em triplicata), sendo eles o Kit 4IN1 BTSQ (famílias de antibióticos analisadas: Tetraciclina, Sulfonamidas, Fluoroquinolonas e Beta-lactâmicos); Kit 2IN1 BTCef (famílias de antibióticos analisadas: Beta-lactâmicos, Cefalexina e Tetraciclina) e o kit 4 em 1- BTSQ (famílias de antibióticos analisadas: Beta-lactâmicos, Tetraciclina, Sulfonamidas e Quinolonas). A legislação brasileira na Instrução Normativa n.º 77, de 26 de novembro de 2018 (BRASIL, 2018) explica que na recepção do leite cru refrigerado, deve-se realizar, no mínimo, dois grupos de antimicrobianos.

3.3.3 Análise físico-químicas do leite

As análises físico-químicas do leite cru foram realizadas conforme as seguintes metodologias: acidez titulável (BRASIL, 2018); estabilidade ao álcool 72 (v/v) (BRASIL, 2006); densidade relativa (15/15 °C) (BRASIL, 2006) e índice crioscópico (°H) (BRASIL, 2018). As demais análises físico-químicas do leite cru foram realizadas em laboratório externo credenciado pelo MAPA (Unianálises, Lajeado-RS), de modo sendo realizadas as seguintes: CCS, gordura, lactose anidra, sólidos não gordurosos e sólidos totais, conforme metodologia oficial, conforme a IN n.º 77 (BRASIL, 2018). Também foi realizada a análise de CPP do leite cru em laboratório externo credenciado pelo MAPA (Unianálises, Lajeado-RS), sendo coletados três frascos, contendo cerca de 45 mL cada.

3.4 ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS DOS QUEIJOS

As análises físico-químicas e microbiológicas dos queijos foram realizadas ao longo de sessenta dias de sua maturação. A periodicidade de coleta e amostragem foi de (0, 15, 30, 45 e 60 dias de maturação), conforme a Figura 3. As análises físico-químicas foram realizadas conforme a regulamentação brasileira na Portaria 146, de 11 de março de 1996 e Instrução Normativa n.º 68 de 12 de dezembro de 2006 (BRASIL, 1996; BRASIL, 2006), descritas abaixo.

3.4.1 Umidade

Pesou-se 5g da amostra de queijo em um cadinho, previamente dessecado, em seguida, levado para estufa (Cap-lab, São Bernardo do Campo) a 102 ± 2 °C por 2 horas, após foi resfriado em dessecador até temperatura ambiente, em seguida, foi pesado. Na sequência, foi novamente para a estufa por mais uma hora e após isso, resfriado e pesado. Para a confirmação de que o peso se manteve constante, o cadinho foi novamente para a estufa por mais três horas, sendo posteriormente resfriado e pesado (BRASIL, 2014). Para o cálculo da umidade foi utilizada a fórmula, abaixo:

$$Umidade (\%) = \frac{Mp \cdot 100}{Mi}$$

Onde:

- Mp = massa perdida na secagem
- Mi = massa inicial

3.4.2 pH

Foi pesada 10g da amostra de queijo e, após, foi triturada em um equipamento homogeneizador. Então, foi colocada em um béquer com 100 mL de água destilada para

diluição. A leitura do pH foi realizada com o pHmetro digital (modelo Datalogger-Digital Instruments) previamente calibrado, operado conforme as instruções do manual do fabricante (LUTZ, 2008).

3.4.3 Acidez titulável

Para realizar a análise de acidez em ácido láctico, 5 g da amostra de queijo foi pesada e adicionada em um *erlenmeyer* de 250 mL, após isso, foi acrescentado 50 mL de água a 40 °C, ou seja, morna, isenta de gás carbônico, onde foi agitada até dissolução. Em seguida, foi adicionado 4 gotas de fenolftaleína e, após, foi titulado com solução de hidróxido de sódio 0,1 mL/L, até coloração rósea persistente (BRASIL, 2006). As análises foram feitas em triplicata. Após a titulação, foi calculado a % de acidez pela fórmula descrita, abaixo:

$$\text{Acidez} = \frac{V \cdot F \cdot 0,9}{m}$$

Onde:

- Acidez = % (m/m) de compostos ácidos expressos em ácido láctico;
- V = volume da solução de hidróxido de sódio 0,1 mol/l gasto na titulação em mL; f = fator de correção da solução de hidróxido de sódio 0,1 mol/l;
- 0,9 = fator de conversão para ácido láctico;
- m = massa da amostra na alíquota em gramas.

3.4.4 Teor de gordura

Foi pesado 3g da amostra homogeneizada diretamente no copo do butirômetro de queijo (40%) e foi acoplado o copo do butirômetro à parte inferior, de forma a ficar bem vedado. Em seguida, foi adicionado 5 mL de água e após 10 mL da solução de ácido sulfúrico (densidade 1825) e 1 mL de álcool isoamílico ao butirômetro. Foi transferido o butirômetro para banho-maria a 65 °C para auxiliar na dissolução da amostra, por cinco minutos.

Após, foi colocada a tampa no butirômetro e a solução foi agitada até a completa dissolução. Posteriormente, foi retirada a tampa superior do butirômetro e adicionada água até

a sua última marcação, sendo enxugada a borda do butirômetro com papel absorvente, em seguida, colocada a sua tampa. Depois do butirômetro, foi centrifugado por 10 minutos a 1200 rpm. Feito isso, foi lida a porcentagem de gordura diretamente na escala do butirômetro. Então foram repetidas as operações de aquecimento e centrifugação para uma melhor leitura do resultado, sendo refeita a leitura da porcentagem de gordura da amostra, diretamente na escala do butirômetro, conforme Instrução Normativa n.º 68 de 12 de dezembro de 2006 (Brasil 2006).

3.4.5 Gordura no extrato seco (GES)

Para se determinar o valor da gordura no extrato seco, foi realizado conforme metodologia descrita por Manual de Métodos Oficiais para Análise de Alimentos de Origem Animal (BRASIL, 2019) e Pereira (2014), sendo realizado este cálculo:

$$\frac{GT \times 100}{ES} = GES$$

Onde:

- GT = Gordura total obtida a partir do cálculo da porcentagem resultante do butirômetro
- 100 = conversão para porcentagem
- ES = extrato seco, obtido a partir da subtração de 100% – porcentagem resultante do cálculo de substâncias voláteis.

3.4.6 Teor de Cloreto de sódio (NaCl)

O método argentométrico foi usado para determinar a concentração de cloreto de sódio nas amostras de queijo. Este método é baseado na titulação de cloretos contra nitrato de prata, precipitando como cloreto de prata a um pH ligeiramente alcalino, segundo Adolfo Lutz (2008).

3.4.7 Atividade de água (Aw)

Para medir a atividade de água da amostra de queijo foi pesado 2 a 3 g de queijo e, após, foi triturada. Feito isso, foi acondicionada em um porta amostra. A leitura da atividade de água (A_w) foi realizada com o equipamento LabSwift – A_w da marca Novasina (2021), previamente calibrado e foi operado segundo as instruções do manual do fabricante.

Cada análise descrita acima (item 3.4.1 ao 3.4.6) foi realizada em triplicata e os resultados foram avaliados estatisticamente, utilizando o programa Statistica® versão 7.0 (STATSOFT, 2004), sendo que para cada temperatura de maturação (5, 12,5 e 20 °C) foram calculadas as médias \pm desvio padrão e comparadas entre elas pelo teste de Tukey, com intervalo de confiança de 95 % ($p \leq 0,05$).

3.5 ANÁLISES MICROBIOLÓGICAS DOS QUEIJOS

As análises microbiológicas foram realizadas com base na metodologia oficial brasileira (BRASIL, 2019; BRASIL, 1996), conforme descrito a seguir.

3.5.1 Contagem da população de coliformes termotolerantes e totais

Para a contagem da população de coliformes totais e termotolerantes, pesou-se $25g \pm 1,25g$ de QAS em 225 mL de água peptona 0,1% e homogeneizado. Após isso, a amostra foi homogeneizada por cerca de sessenta segundos no equipamento chamado *stomacher*.

Posteriormente, foi inoculado 1 mL, da solução já homogeneizada na placa de cultura 3M Petrifilm™ (para a contagem de coliformes totais, é utilizada a placa de cultura 3M Petrifilm™ EC e para a contagem de coliformes termotolerantes, a placa de cultura 3M Petrifilm™ CC), no centro do filme inferior da placa. Feito isso, foi baixado o filme sutilmente sobre a amostra, evitando a formação de bolhas e o espalhamento da amostra além do filme. Em seguida, com a superfície plana para baixo, foi posicionado o difusor 3M Petrifilm™ sobre o filme superior da placa sobre o inóculo, sendo pressionado gentilmente o difusor, distribuindo a amostra sobre a área circular antes da gelificação do meio. Após, aguardou-se um minuto para a formação do gel.

As placas foram incubadas com o filme superior voltado para cima e a sua incubação ocorreu em estufa estéril, sendo que para os coliformes termotolerantes, a temperatura de incubação foi de 35 °C por 24 horas e para os coliformes totais de $44,0 \pm 1,0$ °C por $24 h \pm 2 h$. Após esse período, as colônias foram contadas no equipamento contador de colônias (CP 608-

PHOMIX Ltda., São Paulo-SP) e estimados os seus resultados. A metodologia da contagem dos coliformes totais seguiu procedimento conforme (AOAC Intl., OMA - 21ª Edição, Método 991.14) e para o NMP de Coliformes Termotolerantes a 45 °C (APHA. *Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods. Chapter 9. 5.ª ed. 2015*).

3.5.2 Pesquisa de *Staphylococcus coagulase positiva*

Para análises de *Staphylococcus coagulase positiva*, alíquotas de diluições em série do produto lácteo em 0,1% (p/v) de água peptona foram adicionadas ao ágar *Baird-Parker* e incubadas a 36 °C por 48h, quando foi verificada a UFC típica. Para análises positivas de coagulase, as UFC típicas foram transferidas para caldo de infusão do coração do cérebro por 24 horas a 36 °C quando as alíquotas foram adicionadas ao plasma do coelho e a coagulação foi observada. Os resultados foram expressos como UFC de coagulase *S. aureus* positiva por grama de queijo, conforme procedimento descrito (ISO 6888-1:1999/AMD 1:2003).

3.5.3 Salmonella

Para as análises de *Salmonella* spp., 25g de queijo, foram diluídas em 225 mL de água peptona. Após isso, a amostra foi homogeneizada por cerca de sessenta segundos no equipamento chamado *stomacher*. Posteriormente, foram incubados a 35 °C por 24 horas, quando a cultura foi transferida para tubos com caldo de Rappaport e mantida a 41 °C por 24 horas.

Em seguida, foi feita a galvanização diferencial seletiva em *Salmonella-Shigella* Agar e Bright Green Agar, placas e mantida a 35 °C por 24 horas, quando foi verificada a presença de UFC típica. Os resultados foram expressos como presença ou ausência de *Salmonella* em 25g de produto (BRASIL, 2001, 2003), conforme procedimento (AOAC Intl., OMA - 21ª Edição, Método 2011.03).

3.5.4 *Listeria monocytogenes*

Para a identificação da presença de *Listeria monocytogenes* foram realizadas diluições de 25g de queijo em caldo de enriquecimento seletivo *Listeria* por 24h a 30 °C, quando alíquotas foram transferidas para o caldo Fraser e mantidas por 48h a 36 °C. As colônias foram transferidas para o ágar Oxford, ágar Palcam e Ácido Triptose Nalidixic e incubados a 36 °C

por 72h, quando foram observadas as típicas UFC. Os resultados foram expressos como presença ou ausência de *Listeria monocytogenes* em 25g de produto (BRASIL, 2001, 2003), conforme procedimento (AOAC, 2004).

3.5.5 *Escherichia coli*

O procedimento para análise de *Escherichia coli* foi realizado segundo a (ISO 16649-2:2001), pesando 25 gramas de amostra de queijo, adicionado em 225 mL de diluente salino Peptona 0,1% e homogeneizado. Foram, então, realizadas diluições em série, e o ágar glucurônico triptona-bíbulas (TBX) foi adicionado à solução. As placas foram incubadas invertidas a $44,0 \pm 1,0$ °C por 18 a 24 horas. Posteriormente, as colônias típicas positivas de *Escherichia coli* β-glucuronidase- em cada placa foram somadas. As colônias típicas de *Escherichia coli* β-glucuronidase-positiva são coloridas de azul esverdeado em ágar glucurônico triptônio (TBX) (ISSO, 2001).

3.5.6 Enterotoxinas estafilocócicas

Para verificar a presença/ausência de enterotoxinas estafilocócicas nos queijos, o procedimento foi realizado segundo o método AOAC (2007), onde uma alíquota de 25 g de queijo foi previamente embebida em 40 mL de 38 ± 2 °C de água destilada e homogeneizada em alta velocidade. Em seguida, a amostra descansou por 30 minutos a 18-25 °C, após, o pH da mistura deve ser ajustado para resultar entre 3,5 e 4,0 e 5 N de solução de HCl.

Após ajustar seu pH, a amostra foi centrifugada por 15 minutos a uma velocidade de 3000-5000 rpm sob uma temperatura de 18 – 25 °C. O líquido sobrenadante deve ser recuperado e seu pH ajustado com NaOH (7,5 8,0), com solução de 1 N NaOH. Em seguida, a suspensão foi ser centrifugada novamente por 15 minutos (18 25 °C) e filtrada, se necessário. O filtrado foi recuperado. O resultado da análise é considerado positivo quando o valor do teste calculado pelo instrumento for maior que 0,13, conforme procedimento descrito na (AOAC, 2007).

Todas as amostras de leite e queijo foram refrigeradas e transportadas em caixas isotérmicas, sob temperatura de 5 °C, e cada análise foi realizada em triplicata; e os resultados foram avaliados estatisticamente, utilizando o programa Statistica® versão 7.0 (STATSOFT, 2004), sendo que para cada temperatura de maturação (5, 12,5 e 20 °C), foram calculadas as médias \pm desvio padrão e comparadas entre elas pelo teste de Tukey, com intervalo de confiança de 95% ($p \leq 0,05$).

3.6 SEQUENCIAMENTO DE NOVA GERAÇÃO (NGS), PARA A IDENTIFICAÇÃO DE BACTÉRIAS)

Uma alíquota de 250 g de queijo (coletada em cinco diferentes pontos do queijo) foi congelada (-18 °C); foi posteriormente enviada, sob refrigeração, para um laboratório acreditado para proceder à análise molecular. A identificação de bactérias foi realizada, utilizando-se o sequenciamento de alto desempenho das regiões v3/v4 do gene 16s rRNA. O preparo das bibliotecas seguiu um protocolo da empresa Neopropecta Microbiome Technologies (BRASIL, 2021). Foi realizada a amplificação com *primers* para região v3-v4 do gene rDNA 16S, 341f (CCTACGGGRSGCAGCAG) (WANG *et al.*, 2009) e 806r (GGACTACHVGGGTWTCTAAT) (CAPORASO *et al.*, 2012).

As bibliotecas foram sequenciadas, utilizando-se o equipamento MiSeq Sequencing System (ILLUMINA Inc., USA). Para o sequenciamento *paired-end*, os kits V3 com 600 ciclos ou V2 com 500 ciclos foram utilizados. Se for *single-end*, o kit V2 com 300 ciclos foi utilizado. As sequências foram analisadas por meio do *pipeline Sentinel*. No *pipeline Sentinel* os arquivos *fastq* foram avaliados quanto à qualidade *Phred* (QP) usando o programa FastQC v.0.11.8 (ANDREWS, 2010). Posteriormente, os arquivos *fastq* foram submetidos à trimagem de primers e sequências com baixa qualidade (*Phred* < 20). O *software* da empresa Neopropecta® foi utilizado para tal finalidade, sendo construído em Python v.3.6, sendo este inspirado nas funcionalidades do projeto BioPython (COCK *et al.*, 2009). Para dados *paired-end*, antes da etapa de trimagem, dois pares de arquivos (R1 e R2) foram unidos em só arquivo usando *pandaseq* v.2.11 (MASELLA *et al.*, 2012).

Os *clusters* com abundância menor do que 2 foram removidos das análises, pois tais estruturas são normalmente relacionadas às sequências quimeras (SMYTH *et al.*, 2010). As identificações taxonômicas são realizadas com *blastn* v.2.6.0+ (ALTSCHUL *et al.*, 1990), usando como referência um banco de dados da empresa Neopropecta®. Quanto a definição de uma espécie, dentre os 20 hits retornados para cada cluster, uma instrução em Python avalia se um dos três quesitos seriam atendidos pelos hits, como o maior bit-score, menor avaliação e taxonomias com maior representação.

Os hits que atenderam um dos itens anteriores, foram escolhidos como espécie representante. Essas análises foram realizadas na plataforma computacional da Amazon®, onde a estrutura de bioinformática da Neopropecta® está hospedada. Os bancos de dados de

sequências para os genes 16S rRNA e ITS, contam com sequências de genes completos (em sua maioria), os quais contém sequências recuperadas de genomas, não ambíguas e filtradas para sequências quimeras.

Para a identificação das espécies de micro-organismos presentes nas amostras, as sequências de DNA obtidas foram comparadas com um banco de dados, contendo outras sequências de DNA de espécies já caracterizadas. O sequenciamento foi realizado no equipamento MiSeq Sequencing System (Illumina). Posterior às análises de bioinformática, os resultados foram carregados na plataforma Neobiome® (ID OS18064.1) para visualização e avaliação.

Para a análise NGS do leite cru, foi coletado 500 mL de leite, e posteriormente congelado e enviado ao laboratório credenciado, conforme procedimento descrito no item 3.5.

3.7 SEQUENCIAMENTO DE NOVA GERAÇÃO (NGS), PARA A IDENTIFICAÇÃO DE FUNGOS

Para a identificação de fungos nas amostras de queijos, foi seguido o mesmo procedimento para a identificação de bactérias (item 3.6), porém, a distinção entre as duas metodologias somente ocorreu quanto à amplificação para a região ITS, utilizando primer, ITS1 (GAACCGCGGARGGATCA) (SCHMIDT *et al.*, 2013).

3.8 ANÁLISES DOS DADOS

As avaliações coletadas com os checklist aplicados foram transcritos em planilha do Microsoft Office Excel 2007 para a análise dos dados. Os experimentos foram realizados em triplicata, e os dados médios foram comparados pelos testes de *Student*, sendo que as diferenças foram consideradas significantes quando $p \leq 0,05$.

A correlação entre a população de bactérias e os parâmetros físico-químicos foram avaliados pelos valores de correlação de Pearson. Além disso, a regressão Parcial Menos Quadrado (PLS), um método multivariado, que estabelece relações lineares entre um conjunto de preditores (bloco X, parâmetros físico-químicos) e respostas (bloco Y, população de micro-organismos) foi realizado para cada grupo de bactérias, a fim de estabelecer quais parâmetros físico-químicos estão relacionados com a inativação de micro-organismos (NOKELS *et al.*, 2010). Todas as análises estatísticas foram realizadas, utilizando XLSAT (Addinsoft, Paris, França, versão 2021.3.1).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 PRODUÇÃO DO QUEIJO ARTESANAL SERRANO

De acordo com Teixeira (2011), o processo de fabricação do queijo maturado se dá em quatro etapas, sendo a primeira, a ordenha e a filtragem do leite; a segunda, a coagulação, corte da coalhada, dessoragem e salga; a terceira, a enformagem e prensagem; e a quarta, a maturação do queijo. A legislação que rege o QAS e a produção de queijos artesanais no Rio Grande do Sul (RS, 2014; RS, 2018; RS, 2021), estão sendo executadas na propriedade, conforme cada peculiaridade apresentada abaixo. Na Figura 4, pode-se observar o fluxograma de produção do QAS, observado na agroindústria, objeto deste estudo.

Figura 4: Fluxograma de produção do QAS.



Fonte: (Própria, 2022).

4.1.1 Ordenha do leite

O leite é ordenhado dos animais pela manhã ou no final da tarde, com o auxílio de ordenhadeira mecânica com capacidade de 300 litros de leite, sendo transportado em tarros

plásticos higienizados, e, após, depositado em um resfriador de leite tipo expansão direta, assim como preconiza o RTIQ do leite cru refrigerado (BRASIL, 2018).

Segundo IN 77 de 26 de novembro de 2018 (BRASIL, 2018), as instalações da ordenha devem ser mantidas limpas antes, durante e após a obtenção do leite, sendo que a manutenção e a higienização da ordenhadeira devem ser realizadas conforme a recomendação do fabricante do equipamento.

4.1.2 Resfriamento do leite

O leite é ordenhado dos animais pela manhã ou no final da tarde, com o auxílio de ordenhadeira mecânica com capacidade de 300 litros de leite, transportado em tarros plásticos higienizados, e, após, depositado em um resfriador de leite tipo expansão direta, assim como preconiza o RTIQ do leite cru refrigerado (BRASIL, 2018). Segundo IN 77 de 26 de novembro de 2018 (BRASIL, 2018), as instalações da ordenha devem ser mantidas limpas antes, durante e após a obtenção do leite, sendo que a manutenção e a higienização da ordenhadeira devem ser realizadas conforme a recomendação do fabricante do equipamento.

4.1.3 Resfriamento do leite

A propriedade estudada possui um resfriador tipo expansão e o utiliza para a ordenha à tarde e atende todos os requisitos de resfriamento do leite cru na propriedade, conforme as legislações vigentes (RS, 2018; RS, 2021). Conforme Decreto n.º 54.199, de 24 de agosto de 2018, considera-se leite recém-ordenhado, o leite que será processado em até uma hora, após o final da ordenha, não sendo permitida a sua utilização, previamente resfriado, porém, há exceções apenas em caso de existência de uma segunda ordenha no dia, desde que por período inferior a catorze horas e em temperatura inferior a 7 °C. Nesse sentido, a propriedade segue essa regulamentação. Nessa linha, a Instrução Normativa SEAPDR n.º 03, de 11 de fevereiro de 2021, revela que quando for utilizar o leite fresco na produção de queijos artesanais, a produção deve ser iniciada em até duas horas, após o início da ordenha. No que lhe concerne, o leite refrigerado deve ser armazenado em equipamento adequado, sendo de material atóxico, por no máximo 14 horas, após a ordenha. É permitido ainda o seu acondicionamento em vasilhames (em material atóxico) e pode ser armazenado em refrigeradores quando se tratar de

pequenos volumes. Ele também deve ser refrigerado em uma temperatura inferior a 7 °C, em um período de até 3 horas, após o início da ordenha. Na Figura 5, pode-se verificar o tanque de expansão do leite utilizado na propriedade estudada.

Figura 5: Resfriamento do leite na propriedade



Fonte: (Própria, 2022).

4.1.4 Transporte do leite

O transporte do leite cru do resfriador para a sala de produção de queijos, ocorre por tubulações higienizáveis e/ou por baldes plásticos adequadamente higienizados e armazenados em local apropriado. A propriedade não compra leite de outras propriedades para a produção do QAS, sendo que esta prática também não é permitida pela legislação (RS, 2018). A Instrução Normativa SEAPDR n.º 03, de 11 de fevereiro de 2021 (RS, 2021) prescreve que o transporte do leite na granja leiteira deve possuir condições higiênicas do leite até a queijaria, o que no local é respeitado. A legislação expõe que as instalações da queijaria devem possuir um local adequado e coberto para a transferência do leite para o seu interior, sendo que as tubulações devem ser de material atóxico, de fácil higienização e não oxidável para a entrada do leite e saída do soro, permanecendo vedada, quando estiver em desuso. O RTIQ do QAS (RS, 2018) descreve sendo proibida a aquisição de leite de outras propriedades, mesmo sendo próximas à micro queijaria. Entretanto, segundo Rio Grande do Sul (2021), que dispõe sobre a produção e a comercialização de queijos artesanais de leite cru no estado do RS, essa prática é permitida, inclusive, esse transporte pode ser realizado por tarros, desde que seja respeitado o período máximo de processamento do leite na queijaria, conforme citado acima.

4.1.5 Filtragem do leite

A filtração do leite ocorre por filtros de papel descartáveis (Figura 6), antes de seu envio ao tanque de processamento de queijos, sendo essa etapa considerada um ponto crítico de controle (PCC). O processo de filtração é importante para se conseguir remover partículas sólidas que ficam retidas no filtro (KORAKHASHVILI *et al.*, 2016). Conforme orienta Rio Grande do Sul (2021), todo o leite destinado à fabricação de queijos artesanais deve ser filtrado, antes de qualquer operação (refrigeração ou processamento). Essa etapa é fundamental na agroindústria, pois evita que partículas sólidas da ordenha e utensílios contaminem o leite e o queijo.

Figura 6: Filtragem do leite cru.



Fonte: (Própria, 2022).

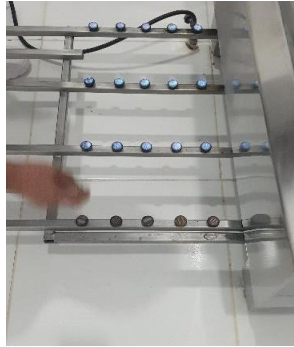
4.1.6 Aquecimento do leite

Após a adição do coalho, o leite é aquecido em temperatura de 32 °C (Figura 7), e conforme Franco (1981), esta temperatura é a ideal para a atividade das enzimas do leite.

O aquecimento do leite ocorre por um fogareiro ligado com gás butano, em suporte acoplado embaixo do tanque de fabricação do queijo. O processo de aquecimento ocorre sob agitação do leite, para uma maior uniformização da temperatura e melhor homogeneização do coalho. Rio Grande do Sul (2021) recomenda que para a produção de queijos artesanais, é

permitido a utilização de fogareiro a gás ou qualquer fonte de calor que não ocasione risco de contaminação na fabricação do queijo.

Figura 7: Aquecimento do leite.



Fonte: (Própria, 2022).

4.1.7 Coagulação

A coagulação do leite ocorre através da adição de coagulante sob o leite (Figura 8), a proporção utilizada na propriedade é de 7 mL de coalho para 10 litros de leite. O QAS então é fabricado com leite cru sem a adição de inóculo inicial, apresentando, dessa maneira, uma diversificada população microbiana, proveniente do próprio leite, e também das condições higiênico-sanitárias às quais é submetido (ALMEIDA, 2014).

Figura 8: Adição de coalho no leite.



Fonte: (Própria, 2022).

4.1.8 Descanso da massa

Na agroindústria, após a adição de coalho no leite, a massa de queijo é deixada repousando em torno de 45 a 60 minutos, conforme recomenda o Decreto n.º 54.199 de 24 de agosto de 2018 (RS, 2018).

4.1.9 Aquecimento e agitação da coalhada

Após o descanso da massa, ocorre mais um aquecimento da coalhada, até atingir uma temperatura de 38 °C (Figura 9). A agitação é realizada para evitar que os cubos formados precipitem. No início da agitação, é importante que se faça movimentos lentos, evitando o rompimento dos cubos e perda de massa. Quando os grãos ficarem mais firmes, a agitação poderá ser intensificada.

Figura 9: Aquecimento da coalhada.



Fonte: (Própria, 2022).

4.1.10 Corte da massa

Após este aquecimento, a coalhada é cortada por liras com fios de inox (Figura 10). A coalhada necessita ter uma boa consistência para sofrer o corte, pois busca-se evitar, ao máximo, as perdas de gordura e caseína (NORONHA, 2003; FERREIRA, 2010). O tipo de corte

realizado caracterizará o tipo de queijo, sendo que quanto maior a duração e menores os fragmentos da coalhada, maior o dessoramento e menor a umidade do produto final (MACHADO, 2020). Quando o corte é efetuado no momento certo, o soro apresenta-se com aspecto verde-amarelado, observada essa coloração do soro na agroindústria. A Instrução Normativa n.º 07 de 9 de dezembro de 2014 menciona que a quebra da coalhada deve ser em pedaços superiores a 2 cm, com ou sem a adição de água quente (70 a 80 °C), verificada também esta prática *in loco*.

Figura 10: Corte da massa.



Fonte: (Própria, 2022).

4.1.11 Dessoragem

A dessoragem é a retirada do soro da massa (Figura 11), sendo ele enviado para a alimentação de bezerros da propriedade, por tubulação passível de ser devidamente higienizada e específica para tal finalidade. O dessoramento acelera, controladamente, a expulsão do soro. Ele engloba um conjunto de ações, tais como o corte, divisão controlada do gel para aumentar a superfície de expulsão de soro, agitação da coalhada e prensagem. A dessoragem libera o soro lentamente, trabalhada gradativamente com as mãos, permitindo a separação dos grãos, até se separar a quantidade de soro desejada da massa (MACHADO, 2020). A coalhada é coada e

espremida para facilitar a sinérese, antes da enformagem e prensada mecanicamente, por 24 horas (RS, 2014).

Figura 11: Dessoragem da massa.



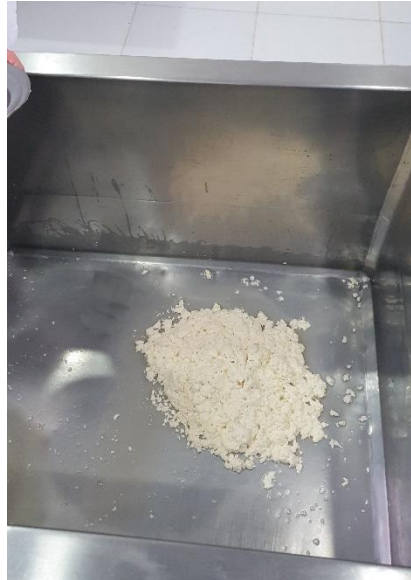
Fonte: (Própria, 2022).

4.1.12 Salga

A salga do queijo ocorre através da mistura de sal com água sem cloro, preparada na propriedade (Figura 12). O sal é um componente muito importante na produção de queijos, pois além de ser um agente sávido, é também um dos fatores que assegura a qualidade e segurança do queijo, devido ele diminuir a sua atividade da água (A_w). O sal (NaCl) possui várias funções nos queijos, tais como: controle do desenvolvimento microbiano, sabor, regulação dos processos bioquímicos (enzimas) e físico-químicos, conservação, entre outros. Ele possui grande influência na etapa final da fabricação sendo a maturação, uma vez que se não for bem conduzida, pode afetar a atividade microbológica e enzimática de um queijo e ser a causa de várias problemáticas no produto (FOX, 2000).

O sal também facilita a agregação da coalhada e extração de soro, ajudando na desidratação da coalhada (GANESAN *et al.*, 2014). A Instrução Normativa n.º 07, de 9 de dezembro de 2014, cita que se pode admitir que a salga do queijo seja realizada diretamente no leite durante a filtração ou na massa, antes de sua enformagem.

Figura 12: Salga da massa de queijo.



Fonte: (Própria, 2022).

4.1.13 Enformagem

A enformagem dos queijos ocorre em formas de diferentes tamanhos (1, 2 e 5 quilos), sendo enformados sob um tecido dessorador poroso e sintético (Figura 13). A massa é acondicionada em formas cilíndricas ou retangulares de material plástico tipo PVC e com dessoradores para evitar que a massa do queijo se prenda na parede, e, para facilitar a saída do soro (NASSU *et al.*, 2006).

Figura 13: Enformagem do queijo.

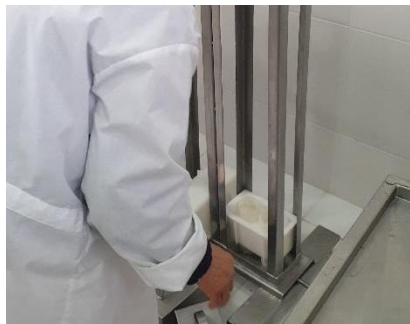


Fonte: (Própria, 2022).

4.1.14 Prensa

O queijo, após enformado, é prensado em formas por, no máximo, vinte e quatro horas para ganhar forma (Figura 14), conforme o recomendado por Rio Grande do Sul (2018), sendo este virado após doze horas de prensagem para maior uniformidade das peças. Nas prensas, ocorre o final do dessoramento do queijo, saindo a quantidade de soro apropriada (FAGAN *et al.*, 2017).

Figura 14: Prensagem do queijo.



Fonte: (Própria, 2022).

4.1.15 Maturação

A maturação dos queijos ocorre em câmara de maturação sobre prateleiras de madeira de araucária aplainada sem pintura (Figura 15). Nessa etapa, são controladas a umidade e a temperatura de maturação dos queijos, sendo que o período mínimo de maturação dos queijos deve ser de sessenta dias, conforme a legislação (RS, 2018). Então, a maturação do QAS deve ser realizada por no mínimo 60 dias e com temperatura superior a 5 °C, em local ventilado e seco (RS, 2014). É permitida a maturação dos queijos artesanais em outro estabelecimento, desde que cumpram todas as exigências legais e sanitárias vigentes (RS, 2018; 2021). A Instrução Normativa SEAPDR n.º 03, de 11 de fevereiro de 2021, explana sendo permitida a maturação de queijos artesanais em ambiente climatizado ou em temperatura ambiente, sendo que as queijarias com uma produção inferior a 100 litros de leite por dia, que realizem a maturação em temperatura ambiente ficam permitidas a realização do processo de maturação, o fracionamento e embalagem dos queijos no mesmo ambiente de produção.

Elas estão também dispensadas de possuírem ambientes de estocagem e almoxarifado, porém devem obedecer ao fluxo de produção que não propicie contaminação cruzada. O Decreto n.º 54.199 de 24 de agosto de 2018 explica que as queijarias devem identificar o QAS e/ou no lote a data de processamento do produto, a fim de evitar que o queijo seja comercializado antes de sua maturação mínima.

Figura 15: Maturação dos queijos.



Fonte: (Própria, 2022).

4.1.16 Embalagem e expedição

Após o tempo de maturação, os queijos são embalados em papel filme aderente sendo rotulados, onde é datado a rastreabilidade do produto, como número do lote, data de fabricação e a sua validade. Os queijos também poderão ser embalados a vácuo com embalagem termo encolhível, disponível para tal finalidade. A Instrução Normativa n.º 07 de 9 de dezembro de 2014 relata que os queijos poderão ser comercializados sem embalagem ou em embalagens primárias microbiologicamente aptas e inócuas aos consumidores. É fundamental que os queijos sejam adequadamente acondicionados e protegidos durante o transporte, para assegurar a qualidade e segurança do produto (FERREIRA, 2010). Os queijos devem ser acondicionados em embalagens plásticas, contendo obrigatoriamente a data de fabricação, data de validade, lote, dados do produtor, isso para a sua rastreabilidade, conforme instruções da Resolução n.º 259 de 20/09/2002 (BRASIL, 2002) e Portaria n.º 371 de 04/09/1997 (BRASIL, 1997).

4.1.17 Transporte dos queijos

O transporte na agroindústria atende o que preconiza a legislação, acondicionado sob embalagem plástica e acondicionado em caixas plásticas, transportado em carrocerias fechadas e atende às boas condições de higiene, sendo que os queijos são acondicionados para evitar a contaminação e a sua deformação (RS, 2021). O transporte dos queijos para a comercialização deve ser compatível com a natureza dos queijos e deve preservar a suas condições higiênicas, de qualidade e tecnológicas, a fim de não comprometer a qualidade dos queijos. Os veículos devem possuir carroceria isotérmica com revestimento interno de material não oxidado, impermeável e de fácil higienização (RS, 2021).

A Lei 15.615 de 13 de maio de 2021 permite o transporte de pequenos volumes de queijos, em caixas isotérmicas higienizadas, com gelo reciclável e higienizado, porém, não é o caso da agroindústria do experimento.

4.1.18 Comercialização

Conforme a Instrução Normativa n.º 07, de 9 de dezembro de 2014, o queijo Serrano deverá ser mantido em temperatura máxima de 12 °C, na sua comercialização. Essa etapa também é muito importante para assegurar os padrões físico-químicos e microbiológicos dos queijos produzidos ao longo de sua vida útil, definido por cada agroindústria. Ainda sobre isso, a legislação não define este limite máximo de validade nos produtos fabricados, ficando ao critério de cada agroindústria. Na agroindústria do experimento, os queijos são comercializados inteiros ou em fatias, embalados ou não, conforme a opção de cada cliente, estipulada a sua validade de quatro meses, após a sua maturação.

A Lei 15.615 de 13 de maio de 2021 descreve que quando o queijo artesanal for comercializado sem embalagem, os estabelecimentos comerciais devem comprovar a sua adequada estocagem, garantindo sua inocuidade e evitando a sua contaminação cruzada. Sendo que a identificação de rastreabilidade deverá estar presente na peça de queijo, por uma marcação de relevo ou com a utilização de um material atóxico, com as seguintes informações mínimas como a sua denominação de venda, estabelecimento produtor e a sua data de fabricação. E, por fim, o produtor deve disponibilizar nos postos de venda ou junto ao queijo, material informativo com as demais informações obrigatórias para o consumidor.

4.2 BPA

Na Tabela 4, pode-se verificar todos os dezesseis itens verificados no cumprimento da IN 77 (BRASIL, 2018) que contemplam as BPA da propriedade estudada. Sendo que todos se apresentam conforme à legislação vigente (BRASIL, 2018, 2021; RS, 2018;2021).

Tabela 4: Avaliação das BPAs na propriedade estudada.

Item	Boas práticas agropecuárias a serem avaliadas	C/NC
I	Manejo sanitário	C
II	Manejo alimentar e armazenamento de alimentos	C
III	Qualidade da água	C
IV	Refrigeração e estocagem do leite	C
V	Higiene pessoal e saúde dos trabalhadores	C
VI	Higiene de superfícies, equipamentos e instalações	C
VII	Controle integrado de pragas	C
VIII	Capacitação dos trabalhadores	C
IX	Manejo de ordenha e pós-ordenha	C
X	Adequação das instalações, equipamentos e utensílios para produção de leite	C
XI	Manejo de resíduos e tratamento de dejetos e efluentes	C
XII	Uso racional e estocagem de produtos químicos, agentes tóxicos e medicamentos veterinários	C
XIII	Manutenção preventiva e calibragem de equipamentos	C
XIV	Controle de fornecedores de insumos agrícolas e pecuários	C
XV	Fornecimento de material técnico como manuais, cartilhas, entre outros	C
XVI	Adoção de práticas de manejo racional e de bem-estar animal	C

Legenda: C= Conforme; NC= Não conforme

Fonte: Adaptado: Brasil (2018).

4.3 BPF

As BPFs representam uma importante ferramenta da qualidade para o alcance de níveis adequados de segurança dos alimentos. Sua adoção é um requisito da legislação vigente e faz parte dos programas de garantia da qualidade do produto final. Elas devem ser aplicadas desde a recepção da matéria-prima, processamento, até a expedição de produtos, como os QAS que vão desde a qualidade da matéria-prima, dos ingredientes e da qualidade da água.

Um programa de BPF é dividido nos seguintes itens: instalações industriais; pessoal; operações; controle de pragas; controle da matéria-prima; registros, documentação e rastreabilidade, entre outros (EMBRAPA, 2015). Nesse sentido, Magalhães *et al.* (2011) afirmam que as boas práticas de fabricação são pré-requisitos indispensáveis para a implantação de qualquer programa de qualidade, e que consiste em um conjunto de princípios e regras para a correta manipulação de alimentos, considerando desde a matéria-prima até o produto final, envolvendo as condições de armazenamento, estruturas de edifícios, condições de equipamentos, sanitização de equipamentos e estabelecimentos, controle de pragas, higiene pessoal e tratamento de efluentes.

Há duas legislações, que citam algumas exigências quanto às BPF que os estabelecimentos que produzem QAS (RS, 2018) e queijarias que produzem queijos artesanais a partir de leite cru no estado do Rio Grande do Sul (RS, 2021).

A agroindústria possui todos os Procedimentos Operacionais Padrão (POP) e programas de qualidade, conforme preconizados pelo SUSAF e pelo Serviço de Inspeção Municipal (SIM) do município de São Francisco de Paula-RS, sendo as características e procedimentos observados na agroindústria estão conforme à legislação vigente (RS, 2018; 2021), conforme anexo A e B.

4.4 ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS DO LEITE

Na Tabela 5, pode-se verificar as análises físico-químicas e microbiológicas do leite refrigerado da propriedade estudada, conforme padrões mínimos e máximos da legislação brasileira (BRASIL, 2018).

Tabela 5: Análises físico-químicas e microbiológicas em leite cru, considerando os seus limites mínimos e máximos, conforme a IN n.º 76.

Análises	Resultado	Limite Mín.	Limite Máx.
Acidez g de ácido láctico/100 mL	0,16 ± 0,00	0,14	0,18
Caseína g/100 g	2,9 ± 0,00	-	-
CCS CS./mL	341.000 ± 24	-	500.000
Cinzas %	0,71 ± 0,00	-	-
CPP UFC/mL	8.000 ± 0,00	-	300.000
Densidade g/mL	1,0315 ± 0,00	1,028	1,034
Estabilidade ao alizarol	74 ± 0,00	72	-
Gordura g/100 g	3,87 ± 0,04	3	-
Índice crioscópico (°H)	-0,530 ± 0,00	-0,555	-0,530
Lactose g/100 g	4,22 ± 0,02	4,3	-
pH	6,76 ± 0,01	-	-
Proteína g/100 g	3,42 ± 0,01	2,9	-
SNG g/100 g	8,88 ± 0,00	8,4	-
ST g/100 g	12,78 ± 0,02	11,4	-
Ureia g/100 g	11,14 ± 0,00	-	-
Detecção de antibióticos	Negativo	Negativo	

*Os valores em negritos e sombreados apresentam as análises não conformes quanto à legislação vigente.

Fonte: (Própria, 2022).

4.4.1 Acidez

A acidez do leite resultou em 0,16 ± 0,01g/ ácido láctico, estando conforme o padrão da legislação brasileira (0,14 a 0,18 g ácido láctico) (BRASIL, 2018). Segundo Tronco (2008), o teste de acidez do leite detecta o aumento na concentração de ácido láctico pela ação das bactérias mesófilas quando fermentam a lactose, indicando uma matéria-prima inadequada quando a acidez titulável for superior a 0,18 g/100mL. Molina *et al.* (2015), Júnior *et al.* (2013) e Bastos *et al.* (2018) verificaram, então, resultados de acidez no estipulado pela legislação (BRASIL, 2018).

Entretanto, Arbello *et al.* (2021) verificaram em seu experimento que seis amostras (40%) de leite cru refrigerado apresentaram a análise de acidez abaixo do limite mínimo da legislação brasileira (BRASIL, 2018). E, três produtores apresentaram seus limites acima do padrão máximo da legislação (0,19; 0,20; e 0,20 g ácido láctico/100 mL). No que lhe concerne, Santos *et al.*, (2021), em seu estudo, verificaram que em 3 amostras de leite cru refrigerado (75%), apresentaram os padrões da legislação, porém 1 produtor (25%) possuiu a acidez acima da legislação. Os autores indicam que esse leite estava impróprio para o consumo humano.

4.4.2 Caseína

A análise da caseína do leite apresentou valor de $2,90 \pm 0,01$ g/100 g, sendo que a temperatura exerce influência sobre a proteólise e a lipólise, pois as principais enzimas envolvidas nestes processos, plasmina e lipoproteína, lipase, são ativadas quando o leite é submetido à temperatura de refrigeração, causando gradativa desnaturação das proteínas do leite, principalmente a caseína e dos lipídios, principalmente os triglicerídeos (MA *et al.*, 2000). Além da temperatura, a integridade das micelas, segundo De Kruif (2003), depende também da presença dos íons cálcio, aos quais, com a fração K-caseína, formam uma suspensão coloidal estável na estrutura micelar.

Assim, Guimarães *et al.* (2020) encontraram valores de caseína para o leite cru refrigerado de ($2,44 \pm 0,05$, $2,49 \pm 0,09$, $2,52 \pm 0,07$ e $5,53 \pm 0,05$ g/100 g). Contudo, no experimento de Almeida *et al.* (2014), os autores encontraram valores de caseína entre 2,17 a 2,63 g/100g, tendo a média das amostras atingindo 2,43 g/100g.

4.4.3 CCS

A amostra de leite analisada apresentou a contagem de CCS de 341.000 ± 24 CS/mL, apresentando resultado no limite máximo da legislação brasileira (BRASIL, 2018), sendo de 500.000 CS/mL. A CCS alta é um indício de infecções intramamárias em animais em lactação (COSTA *et al.*, 2017) e pode ser proveniente de características genéticas dos animais e de sua imunidade, sendo também correlacionada com outros fatores, como o período de lactação, ambiente, ordem de partos, entre outros (LAVOR *et al.*, 2019). Assim, Martins *et al.* (2015) descrevem algumas outras razões ao aparecimento da CCS, tais como a idade do animal, clima, estágio de lactação da vaca, ocorrência de outras patologias no rebanho, sendo que se um queijo

for fabricado com um leite com alta contagem de CCS no leite pode diminuir a sua vida útil e o seu rendimento, isso porque provoca muitas modificações em sua constituição. A CCS também produz um acréscimo na sua taxa de umidade, intensifica o tempo de coagulação do leite, ocasiona falhas na textura e no seu sabor (CONTI, 2016).

Nesse contexto, Martins *et al.* (2015) analisaram 5.758 amostras de leite de vacas individuais de 7 propriedades do Estado de Goiás, e a CCS média dos rebanhos com mastite subclínica foi cerca de 743×10^3 CS/mL. Entretanto, no estudo de Silva *et al.*, (2019), ao analisar o perfil de produtores da agricultura familiar na região Sul do Rio Grande do Sul e a análise físico-química do leite cru refrigerado, eles encontraram em 33 propriedades (61,1%), a contagem de CCS conforme o padrão máximo da legislação brasileira.

4.4.4 Cinzas

O teor de cinzas encontrado neste estudo foi de $0,71 \pm 0,01\%$. Silva *et al.*, (2017) obtiveram uma variação de cinzas de 0,45% a 0,74%; e conforme Tronco (2008), os componentes minerais representam cerca de 0,60 a 0,80% do peso total do leite, sendo o cálcio, o principal mineral.

4.4.5 CPP

Na análise de CPP do leite, a amostra avaliada resultou em $8.000 \pm 0,01$ UFC/mL, considerado conforme o limite máximo da legislação brasileira, sendo de até 300.000 UFC/ml (BRASIL, 2018). Lange *et al.*, (2017) destacam que uma rotina de limpeza e desinfecção do local dos equipamentos utilizados dos ordenhadores e do úbere dos animais lactantes, ajuda a diminuir a CPP do leite. As condições necessárias para manter a CPP em níveis baixos, incluem também a utilização de pré e pós-dipping, a utilização de água potável e detergentes para a limpeza dos equipamentos e o resfriamento do leite, imediatamente após a ordenha (FRAITAG, 2015; BRASIL, 2018).

No estudo de David *et al.*, (2021), objetivando avaliar a qualidade do leite de cinco produtores do município de Fernandes Pinheiro-PR, os autores verificaram que às três médias geométricas dos produtores estudados estavam no limite máximo da legislação brasileira. De Pré *et al.*, (2018), analisando o leite de dez produtores, verificou que em 26%, o leite estava

conforme à legislação para a CPP. Santos *et al.*, (2021), analisando o leite cru refrigerado de quatro produtores da agricultura familiar, da cidade de Nossa Senhora da Glória-SE, verificaram que 2 amostras (50%) também possuíam o seu acima do limite máximo, exigido pela legislação. Segundo Tonet *et al.*, (2020), um queijo quando produzido com leite de elevada CPP, pode levar ao desenvolvimento de olhaduras não desejáveis, assim como resultar em queijos estufados e não resistir ao longo de sua vida útil.

4.4.6 Densidade

O resultado de densidade do leite foi de $1,0315 \pm 0,02$ g/100 g, estando conforme a legislação para o leite cru refrigerado (sendo de 1,028 a 1,034 g/100 g) (BRASIL, 2018). Um resultado de densidade abaixo de 1,028 pode indicar a adição de água no leite e o resultado acima de 1,034 g/100 g pode significar a adição de outras substâncias ou o seu desnatado (POLEGATO *et al.*, 2003).

Arbello *et al.*, (2021) e Souza *et al.*, (2021) em seus experimentos, verificaram conformidade na análise de densidade do leite cru refrigerado. Entretanto, Santos *et al.*, (2021) verificaram que uma amostra de leite (25%), apresentou resultado acima do padrão para o leite cru refrigerado, tendo o seu resultado em 1,036 g/100g. Os autores explanam que esse resultado pode ser um indicativo de possíveis fraudes no leite por constituintes, por exemplo, a adição de amido, sacarose, dentre outros, que alteram a relação densidade da água e a do leite.

4.4.7 Estabilidade ao alizarol

O leite analisado obteve o seu resultado estável ao alizarol 74 v/v, estando no padrão da legislação brasileira (que deve estar no mínimo estável ao alizarol 72 v/v) (BRASIL, 2018). O teste para verificação da estabilidade ao alizarol é um método rápido e empregado para verificação da resistência do leite ao tratamento térmico (TRONCO, 2003). Souza *et al.*, (2021), em seu estudo, verificaram que as quatro amostras analisadas (100%) concordavam com a legislação brasileira (BRASIL, 2018), resultando em sua estabilidade ao alizarol 72 v/v.

4.4.8 Gordura

O resultado da gordura do leite foi de $3,87 \pm 0,04$ g/100 g, que segundo Brasil (2018), deve estar maior ou igual a 3,0 g/100 g. Segundo Oliveira *et al.*, (2012), a gordura do leite é o componente que mais sofre oscilação, devido a diversos fatores, por exemplo, alimentação dos animais, escore corporal, raça, sua saúde, a temperatura ambiental, dentre outros. Arbello *et al.*, (2021) encontraram um produtor com o seu teor de gordura abaixo do limite mínimo da legislação brasileira (BRASIL, 2018), tendo o seu resultado de 2,17g/100g. Almeida *et al.*, (2020) também observaram três amostras abaixo do padrão mínimo permitido de gordura (2,70, 2,83 e 2,98 g/100g), em 15 propriedades rurais do Município de Cacoal-RO. Santos *et al.*, (2021) observaram conformidade em todas as amostras de gordura do leite cru refrigerado de seu estudo, variando entre $3,67 \pm 0,38$ a $4,23 \pm 0,29$ g/100g.

4.4.9 Índice crioscópico

O índice crioscópico (ponto de congelamento do leite) do leite resultou em $-0,530 \pm 0,000$ °H, estando no limite mínimo da legislação brasileira (BRASIL, 2018). Conforme Zagorska *et al.*, (2013), o índice crioscópico é influenciado por fatores, tais como raça do animal, estágio de lactação, sua idade, estado de saúde, qualidade e quantidade de ração fornecida, estação do ano, pela região que se encontram o rebanho, tempo de ordenha, etc. Segundo Real (2013), a lactose e os cloretos são os que mais afetam o ponto de congelamento.

Marioto *et al.*, (2020) verificaram que uma amostra de leite apresentou o resultado de crioscopia abaixo do limite mínimo da legislação ($-0,529^{\circ}\text{H}$), porém a média das amostras resultou em $-0,537^{\circ}\text{H} \pm 0,007$. Almeida *et al.*, (2020) verificaram que uma das amostras analisadas apresentava o seu valor em $-0,506^{\circ}\text{H}$, os autores associaram este resultado a diminuição da quantidade de lactose e sólidos totais desta mesma amostra, considerada fraudada.

4.4.10 Lactose

O teor de lactose anidra do leite apresentou resultado insatisfatório, estando abaixo do limite mínimo da legislação ($4,22 \pm 0,02$ g/100 g), que deve ser maior ou igual a 4,30 g/100 g (BRASIL, 2018). Os teores de lactose no leite cru dependem, principalmente, da glicose sintetizada no fígado do animal a partir do ácido propiônico produzido no rúmen. O ácido propiônico, no que lhe concerne, é sintetizado em maior quantidade quando uma dieta

balanceada com concentrações corretas de concentrado é ofertada aos animais (PEREIRA, 2010). Além disso, a lactose está relacionada diretamente com a regulação da pressão osmótica na glândula mamária, de forma que, a maior síntese de lactose determina maior produção em volume total de leite (PERES, 2001).

Então, Campos *et al.*, (2006) verificaram que, assim como o teor de gordura do leite diminui quando a produção do leite aumenta, o mesmo comportamento acontece com a lactose; embora a lactose seja o componente menos afetado com a oscilação do volume de leite. Silva *et al.*, (2019) encontraram valores médios para a lactose em 4,46 g/100g e Santos *et al.*, (2021) entre 4,95 a 5,26 g/100g. Guimarães *et al.*, (2020), encontraram valores de lactose no leite cru refrigerado, variando entre 4,19g/100g a 4,50 g/100g. No estudo de Souza *et al.*, (2021), verificou-se um teor de lactose no leite em 3,57 g/100g em uma amostra de leite cru refrigerado, coincidindo com o valor abaixo no teor SNG. Os autores, portanto, explanam que a lactose não é considerada um problema para a produção dos queijos e este resultado pode ser em função da não suplementação de concentrado para os rebanhos leiteiros.

4.4.11 pH

O pH do leite apresentou valor de $6,76 \pm 0,01$, porém não há limite para tal parâmetro na legislação brasileira para o leite cru refrigerado (BRASIL, 2018). O teste de pH do leite é um indicador de qualidade e de sua estabilidade térmica e ele pode sofrer alterações devido a enfermidades no rebanho, refrigeração inadequada do leite ou pela contagem elevada de micro-organismos em sua modalidade crua (PEREIRA, *et al.*, 2010).

Um leite de qualidade deve possuir um pH em torno de 6,60 a 6,80, sendo considerado levemente ácido (SILVA, 2020). Santos *et al.*, (2021) verificaram valores de pH entre ($6,55 \pm 0,06$; $6,68 \pm 0,03$, $6,74 \pm 0,05$ e $6,98 \pm 0,13$), o leite cru refrigerado que apresentou o valor mais elevado de pH ($6,98 \pm 0,13$), pode estar relacionado com a elevada CPP e acidez do leite. No estudo de Marioto *et al.*, (2020), eles verificaram em seu experimento, uma média para a análise de pH de 6,50 a 6,82.

4.4.12 Proteína

Quanto ao resultado de proteína, a amostra apresentou resultado satisfatório, resultando em $3,42 \pm 0,01$ g/100g, atendendo a legislação brasileira (BRASIL, 2018). Leira *et al.*, (2018) relatam que a porcentagem de proteína varia conforme a raça do animal e é proporcional à quantidade de gordura presente no leite. Portanto, quanto maior a porcentagem de gordura no leite, maior será a de proteína. Segundo Cunha *et al.*, (2008), com o aumento no número de células somáticas no leite, aumenta-se também a porcentagem de caseínas, o que não foi verificado nesse experimento.

Desse modo, Almeida *et al.*, (2020) verificaram que duas amostras (13,3%) de leite cru refrigerado estavam abaixo do limite mínimo para a análise de proteína, tendo seus resultados em (2,87 e 2,89 g/100g). Esses padrões foram verificados para os autores Silva *et al.*, (2019), com uma média de 3,26 g/100g, Santos *et al.*, (2021), (entre 3,35 a 3,55 g/100g) e Santos (2020), (entre 3,25, 2,85 e 3,01 g/100g).

4.4.13 Sólidos não gordurosos (SNG) e Sólidos totais (ST)

O resultado de SNG foi de $8,88 \pm 0,01$ g/100g, logo o parâmetro de sólidos totais (ST) resultou em $12,78 \pm 0,02$ g/100g, estando os dois resultados conforme a legislação brasileira (BRASIL, 2018) sendo $\geq 11,40$ e $\geq 8,40$ g/100 g, respectivamente. A análise de ST representa todos os parâmetros físico-químicos do leite, logo o SNG representa todos os elementos de sua composição, menos a água e a sua gordura (CABRAL *et al.*, 2016, MELO, 2020).

Baggio *et al.*, (2017) avaliaram a qualidade do leite no norte do Paraná e observaram uma média inferior de 12,13% para ST. Bueno *et al.*, (2005) verificaram média de 12,61% e por Silva *et al.*, (2009), que obtiveram média de 12,62% de ST, em estudo realizado no Sudoeste Goiano. Motta *et al.*, (2015) encontraram resultados ST, conforme a legislação brasileira, em estudo com leite informal na região Sudeste do estado de São Paulo. Santos *et al.*, (2021), verificaram médias de SNG de 8,85 a 9,32 g/100g; demais autores como Pinto (2012) e Gonçalves *et al.*, (2020) também encontraram valores de SNG superiores aos limites mínimos estabelecidos pela legislação.

4.4.14 Ureia

A ureia do leite apresentou resultado de $11,14 \pm 0,01$ g/100 g. Segundo Riemeier *et al.*, (2004), a quantidade de ureia no leite pode ser indicadora de excessiva degradação de proteínas no rúmen. Guimarães *et al.*, (2020) verificaram variações para a análise de ureia no leite de 8,63g/100g a 11,96g/100g, entre as propriedades avaliadas. No entanto, a média dos níveis de ureia no leite, recomendados pela literatura encontra-se entre 12 mg/dl a 18 mg/dl (CABRAL *et al.*, 2016).

4.4.15 Detecção de Antibióticos

Não foram constatados resíduos de antibióticos no leite da propriedade, ele está, portanto, apto para a fabricação de derivados lácteos, assim como preconiza a legislação brasileira (BRASIL, 2018; RS, 2018). Esse resultado é devido ao controle de aplicação de medicamentos de uso veterinário adotado na propriedade, fazendo com que seja respeitado o prazo de carência dos medicamentos, antes da utilização do leite do animal medicado.

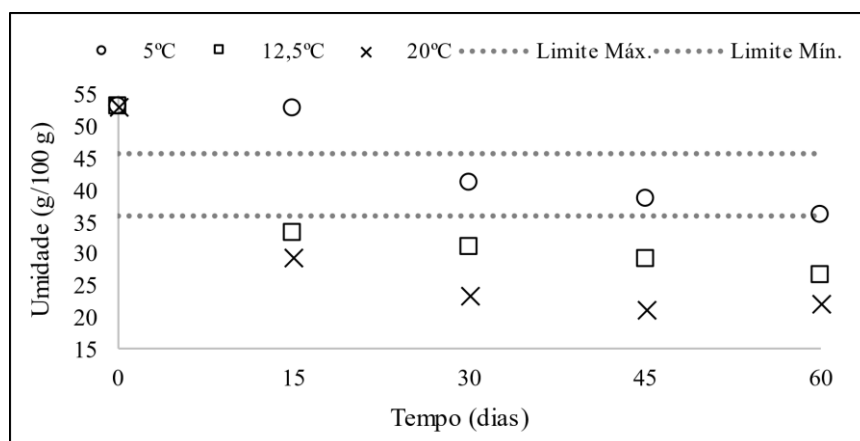
Aguiar *et al.*, (2016) ao analisarem amostras de leite provenientes de 15 tanques de refrigeração utilizando o teste eclipse 50®, constataram que 26,7% das amostras foram positivas na detecção de resíduos de antibióticos. Nessa linha, Freitas *et al.*, (2017) analisando 750 amostras de leite cru refrigerado de um laticínio da cidade de Patos de Minas-MG, utilizando o kit do teste SNAPduo® Beta-Tetra ST, verificaram uma amostra positiva em um compartimento de leite contendo 1.350 litros.

4.5 ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS DO QUEIJO

4.5.1 Umidade

Pode-se verificar que a umidade do QAS no dia D:0 apresentou resultado de $53,10 \pm 0,48$ g/100 g (Figura 26), e ao longo de sua maturação houve um decréscimo em todos os tempos e temperaturas estudadas. Segundo Rio Grande do Sul (2014), o QAS é considerado de média umidade e deve ser observado o seu padrão em RTIQ específico (BRASIL, 1996), sendo 36,0 a 45,9 g/100 g.

Figura 16: Análise de umidade do QAS em diferentes temperaturas (5, 12,5 e 20°C), ao longo do tempo de maturação, considerando os seus limites máximo e mínimo, representados pelas barras em (36 e 45,9 g/100 g)



Fonte: Própria (2022).

No último dia de maturação (D:60), o único queijo que se enquadra na legislação vigente (BRASIL, 1996), para a umidade, foi o QAS maturado na temperatura de 5 °C, apresentando o resultado de $38,0 \pm 0,01$ g/100g. Os queijos maturados nas demais temperaturas (12,5 e 20 °C), apresentaram resultados abaixo do limite mínimo ($21 \pm 0,01$ e $21,0 \pm 0,01$ g/100 g, respectivamente). Os queijos do experimento foram fabricados com uma gramatura de 500 g, portanto, quanto menor for o tamanho da peça de queijo, mais peso ele perderá em menos tempo. Logo, esta é uma das hipóteses desta inconformidade. Entretanto, os produtores de QAS produzem as peças em diferentes gramaturas, entre elas, 500 g, 1, 2 e 5 kg. A diminuição da umidade durante a sua maturação é definida por fatores ambientais e intrínsecos do queijo, sendo o tamanho da peça fabricada determinante para a perda de umidade, sendo que as peças

maiores possuem maior umidade em seu interior por um período maior (MARTINS, 2006; PARK, 2001).

Pires *et al.*, (2020), avaliando três amostras de QAS de uma agroindústria de Santa Catarina-Brasil, em diferentes dias de maturação (15, 37 e 60 dias), respectivamente, verificaram que a umidade deste tipo de queijo resultou em (até 35,9%), considerado como baixo teor de umidade e apresentou conformidade com a Lei 17.003 (SANTA CATARINA, 2016), após 60 dias de maturação. Tavares *et al.*, (2019), ao analisarem 30 amostras de queijo colonial artesanal, produzido na região Sul do Rio Grande do Sul, adquiridos no comércio local e feiras, verificaram uma umidade média de 48,55%. Os autores encontraram umidade superior a 50% em algumas amostras. Eles relatam que estes altos índices podem estar associados ao fato de os produtos estarem expostos para a venda à temperatura ambiente, sem embalagem ou proteção.

Souza *et al.*, (2003), analisando seis lotes de QAS (três produzidos no verão e os outros três no inverno) de três laticínios diferentes, durante cinco tempos de maturação (7, 14, 28, 42 e 60), verificaram que não houve diferença significativa entre a época do ano em alguns parâmetros físico-químicos e microbiológicos analisados, exceto para umidade. Discordando, Menegol *et al.*, (2020), analisando 25 amostras de QAS produzidos nas cidades de Cambará do Sul e São Francisco de Paula-RS-Brasil, no ano de 2019, em diferentes tempos de maturação, (≤ 10 dias; entre 20 e 30 dias; e 45 e 60 dias), sua umidade variou entre ($61,18 \pm 4,13$; $51,12 \pm 0,16$ e $42,45 \pm 5,53$, respectivamente), sendo concluído que a época do ano da produção do QAS possui interferência em sua umidade, pois não há a padronização do controle de temperatura das salas de maturação dos queijos produzidos artesanalmente.

Pode-se, então, verificar abaixo (Figura 17), o aspecto visual do QAS, após sessenta dias de sua maturação (D:60), nas três temperaturas do experimento.

Figura 17: Aspecto visual dos queijos maturados no tempo D:60.

5 °C



12,5 °C



20 °C

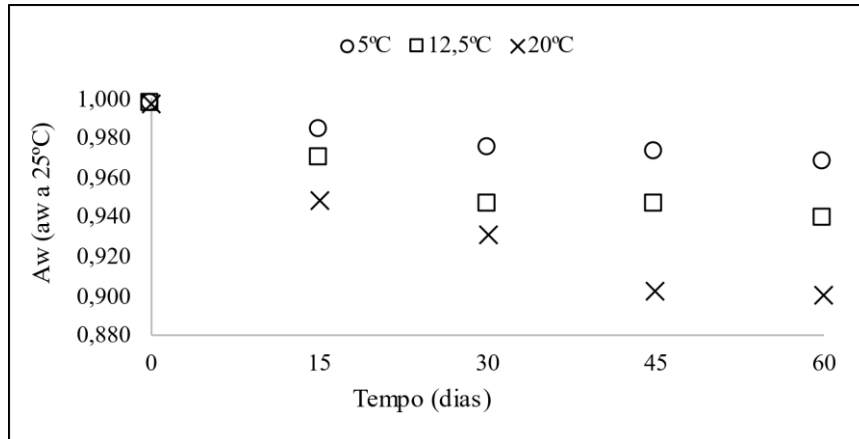


Fonte: Própria (2022).

4.5.2 Atividade de água (Aw)

A atividade de água, de todos os queijos, decresceu ao longo de sua maturação, no dia de sua fabricação (D:0), o QAS apresentou $0,998 \pm 0,01$ (Aw a 25 °C) (Figura 18).

Figura 18: Análise de atividade de água do QAS em diferentes temperaturas (5, 12,5 e 20 °C), ao longo do tempo de maturação.



Fonte: Própria (2022).

E, após os sessenta dias de maturação, houve grande diminuição deste parâmetro. Na temperatura de maturação de 5 °C, o queijo apresentou a sua atividade de água em $0,970 \pm 0,01$, entretanto, na temperatura de 12,5 °C, esse resultado apresentou uma diminuição comparada com a temperatura de 5 °C, e esse valor ainda foi maior na temperatura de 20 °C ($0,900 \pm 0,01$ Aw a 25 °C). Esses resultados possuem relação direta com os de umidade dos queijos, sendo que o queijo que apresentou maior umidade no último dia de maturação, também apresentou o valor mais alto de atividade de água e, assim, inversamente. Há uma correlação da Aw elevada com as altas contagens de coliformes totais e termotolerantes do experimento, sendo que quanto maior a Aw do queijo, mais elevadas foram as contagens destes micro-organismos.

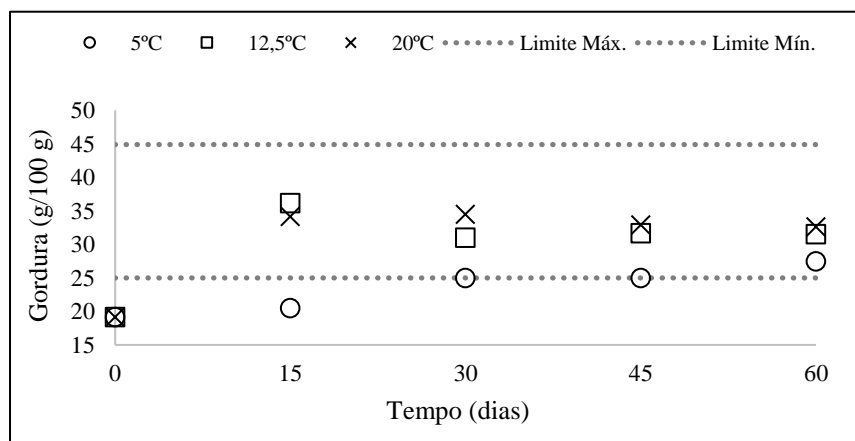
Garcia *et al.*, (2010) relatam que a Aw é o parâmetro que indica qual a quantidade de água disponível em um determinado alimento, visto que ela regula e limita o crescimento de micro-organismos, as reações químicas e enzimáticas, um fator de grande importância durante o período de maturação e comercialização dos queijos. Os valores de Aw variam de 0 a 1, sendo que quanto mais baixo for o valor, maior será a estabilidade microbiológica do produto. Os queijos com maior atividade de água apresentam maior tendência de deterioração por crescimento de micro-organismos deteriorantes e será mais suscetível ao crescimento de micro-organismos patogênicos (NORONHA, 2017).

Nesse sentido, Tavares *et al.*, (2019) encontraram valores medianos de $0,97 \pm 0,01$ de atividade de água nos queijos coloniais analisados. Sousa *et al.*, (2014) encontraram valores de 0,892 para queijos de coalho não inspecionados. Lima *et al.*, (2017) encontraram valores de 0,95 a 0,98 de atividade de água nos queijos artesanais analisados. Benincá (2021), avaliando queijos coloniais produzidos no Vale do Taquari-RS, encontrou atividade de água dos queijos variando entre 0,936 e 0,963.

4.5.3 Gordura

No dia de sua fabricação, o QAS apresentou sua gordura em $19,2 \pm 0,22$ g/100 g, e ao longo de sua maturação (Figura 19), houve um aumento de sua concentração, semelhantemente, foram apresentados por Oliveira (2014), que afirma que o aumento da concentração de gordura durante a maturação dos queijos ocorre devido à perda de umidade, que permite maiores valores de sólidos totais. A concentração de gordura e demais alterações nas características químicas do queijo artesanal Serrano podem ser explicadas devido à composição do leite, que ocorre durante o ano devido a modificações na alimentação dos animais (SOUZA, 2003).

Figura 19: Análise de gordura do QAS em diferentes temperaturas (5, 12,5 e 20°C), ao longo do tempo de maturação, considerando os seus limites máximo e mínimo representados pelas barras em (25 e 44,9 g/100 g).



Fonte: Própria (2022).

Ao final de sua maturação, todos os queijos (5, 12,5 e 20 °C) apresentaram conformidade com a legislação vigente (BRASIL, 1996), sendo de 25,0 a 44,9 g/100 g, tendo seus resultados em ($38,0 \pm 0,01$; $29,0 \pm 0,01$ e $21,0 \pm 0,01$ g/100 g, respectivamente).

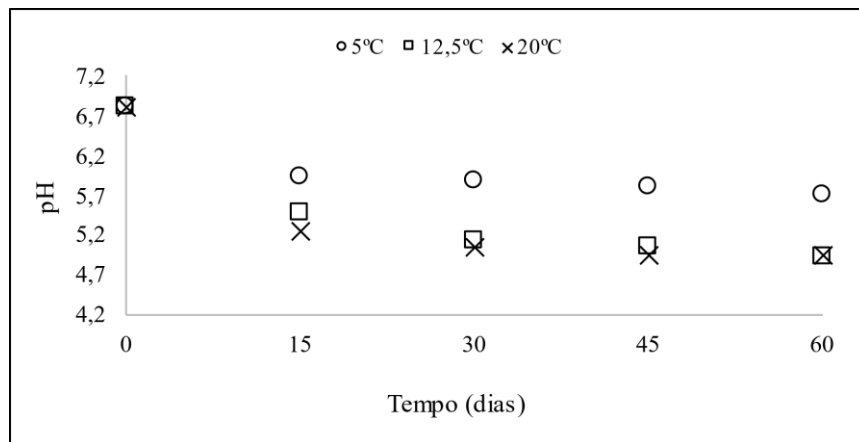
Pires *et al.*, (2020) em seu experimento, verificaram que o QAS com 37 dias de maturação apresentou teor de gordura de 33,57%, este resultado de gordura se repetiu também aos 60 dias de maturação. No estudo realizado por Louvatel *et al.*, (2016) foi encontrado um teor de 14,77 e 32,28% em queijos artesanais maturados de 6 a 14 dias. Segundo o mesmo estudo, as modificações do teor de gordura do queijo podem ser explicadas pela dieta ofertada aos animais, além da influência genética.

Quanto aos resultados de pH dos queijos estudados, pode-se verificar que houve um decréscimo gradativamente em todos os tempos e temperaturas do experimento (Figura 20). No início do ensaio (D:0), o queijo apresentou o seu pH em $6,81 \pm 0,01$; entretanto, no seu último dia de maturação, o queijo, maturado na temperatura de 5 °C, apresentou o seu valor mais elevado que os demais (5,70). Já as demais temperaturas (12,5 e 20 °C) apresentaram valores de $4,92 \pm 0,01$ e $4,94 \pm 0,01$, sendo que os queijos maturados na temperatura menor (5 °C) não decresceram tanto quanto os queijos maturados na temperatura maior (20 °C). Tais resultados vão ao encontro com os resultados de umidade dos queijos e da análise de atividade de água deste experimento.

4.5.4 pH

Quanto aos resultados de pH dos queijos estudados, pode-se verificar que houve um decréscimo gradativamente em todos os tempos e temperaturas do experimento (Figura 20). No início do ensaio (D:0), o queijo apresentou o seu pH em $6,81 \pm 0,01$; entretanto, no seu último dia de maturação, o queijo, maturado na temperatura de 5 °C, apresentou o seu valor mais elevado que os demais (5,70). Já as demais temperaturas (12,5 e 20 °C) apresentaram valores de $4,92 \pm 0,01$ e $4,94 \pm 0,01$, sendo que os queijos maturados na temperatura menor (5 °C) não decresceram tanto quanto os queijos maturados na temperatura maior (20 °C). Tais resultados vão ao encontro com os resultados de umidade dos queijos e da análise de atividade de água deste experimento.

Figura 20: Análise de pH do QAS em diferentes temperaturas (5, 12,5 e 20°C), ao longo do tempo de maturação.



Fonte: Própria (2022).

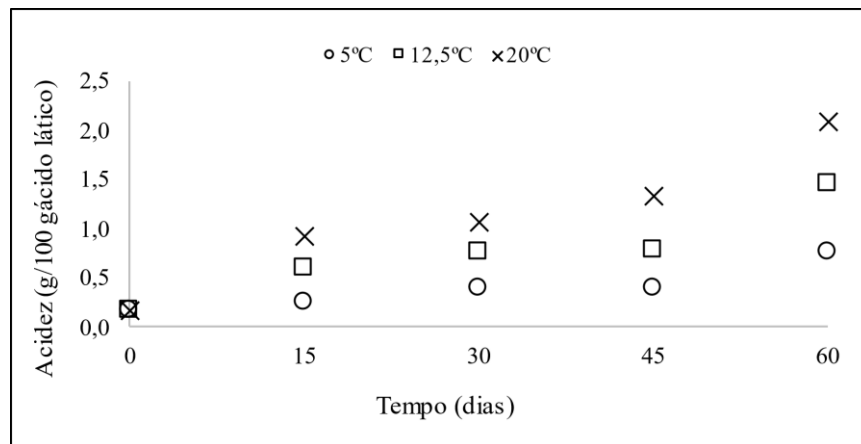
O pH é um atributo com influência direta com controle e crescimento de microorganismos patogênicos, quando o pH está abaixo de 4,6 quase não há crescimento de microorganismos (PINTO *et al.*, 2016). De Sousa *et al.*, (2014), cita que o pH é considerado uma análise muito importante para caracterizar diversos tipos de queijos, devido possuir relação à sua influência na textura, na sua atividade microbiana e em sua maturação, já que ocorrem reações químicas catalisadas por enzimas provenientes do coalho e da microbiota, que dependem do pH.

Segundo Souza *et al.*, (2003), o valor do pH do QAS diminuiu significativamente, durante a primeira semana de maturação, quando atingiu os menores índices durante a sua maturação, resultando em 5,3 no verão e 5,1 no inverno. Os autores concluem que esta redução do pH é consequência da produção de ácido lático pelas bactérias ácido lácticas. No estudo de Pires *et al.*, (2020), foi verificado uma redução do pH do QAS durante a sua maturação, na amostra de queijo com 15 dias de maturação, o pH apresentou resultado de $5,2 \pm 0,02$ e com 60 dias, apresentou valor de $4,95,2 \pm 0,02$. Tavares *et al.*, (2019), analisando o queijo colonial, apresentou valor médio de pH de $5,81 \pm 0,49$, variando entre 4,95 a 6,95. Nesse sentido, Neves *et al.*, (2021), investigando o pH das amostras de queijos artesanais produzidos na região do Norte de Minas-MG/Brasil, verificaram variação no pH de 4,99 a 5,88. Os autores atribuem estas variações ao tempo e à temperatura de processamento dos queijos.

4.5.5 Acidez

Quanto à análise de acidez dos queijos, pode-se verificar que ao longo de sua maturação, houve um acréscimo em todos os tempos e temperaturas (Figura 21). Os maiores resultados foram dos queijos maturados na temperatura de 20 °C ($1,40 \pm 0,01$ g/100 g ácido láctico) no seu último dia de maturação. Já nas demais temperaturas de maturação (5 e 12,5 °C), os resultados foram menores ($0,42 \pm 0,01$ e $0,80 \pm 0,01$ g/100 g ácido láctico, respectivamente). O resultado de acidez do estudo, possui relação com a análise de pH dos queijos, sendo que quanto maior o valor de pH, menor foi a acidez dos queijos, e, assim, inversamente.

Figura 21: Análise de acidez do QAS em diferentes temperaturas (5, 12,5 e 20 °C), ao longo do tempo de maturação.



Fonte: Própria (2022).

A acidez dos queijos é proveniente da produção de ácido láctico, devido à degradação da lactose pelas bactérias e afetam diretamente o pH na expulsão do soro da massa, durante a sua fabricação, e do início da sua maturação (SOUSA *et al.*, 2014). A acidez dos queijos pode ainda aumentar devido à influência da temperatura durante a sua maturação (FERREIRA *et al.*, 2011), este parâmetro pode ser variável, devido ao tamanho dos grãos de coalhada quando cortados, quantidade de sal e método de salga, tempo e temperatura dos queijos prensados, entre outros (SCOTT, 2002). Desse modo, Lempk *et al.*, (2013) afirmam que a variação nos valores da acidez dos queijos também se deve à falta de padronização em sua salgagem.

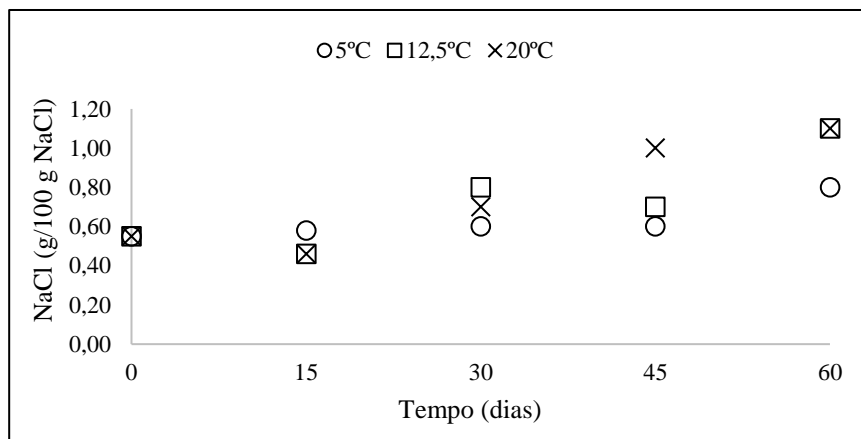
Nessa linha, Tavares *et al.*, (2019) verificaram uma média 0,44 g de ácido láctico/100g para a análise de acidez em 30 amostras de queijos coloniais artesanais produzidos na região Sul do Rio Grande do Sul. Pires *et al.*, (2020) verificaram um aumento na diminuição da acidez durante a maturação de queijos em amostras com 15, 37 e 60 dias, ($1,20 \pm 0,02$, $1,60 \pm 0,03$ e $1,80 \pm 0,0$ respectivamente). Lima *et al.*, (2017), analisando cinco amostras de queijo artesanais

vendidos na cidade de Castro-PR, verificaram resultados de acidez, variando entre 0,14 até 0,96 g/ ácido lático. No experimento de Neves *et al.*, (2021), os valores de acidez resultaram entre 0,35 a 0,49% de ácido lático. Enquanto no estudo de Benincá (2021), foi verificada a acidez de queijos artesanais coloniais produzidos no Vale do Taquari-RS, entre 0,27 a 0,67%.

4.5.6 Cloreto de sódio (NaCl)

Quanto à análise de NaCl (Figura 22), pode-se verificar um acréscimo nos tempos de D:15 ao D:45), porém no último dia de sua maturação, houve uma estabilidade nos resultados, em comparação com a análise anterior (D:45).

Figura 22: Análise de cloreto de sódio (NaCl) do QAS em diferentes temperaturas (5, 12,5 e 20 °C), ao longo do tempo de maturação.



Fonte: Própria (2022).

A adição de sal na fabricação dos queijos é de grande importância, pois, ela é relacionada ao sabor, e é de grande importância na maturação dos queijos, pois interfere nas reações bioquímicas e no desenvolvimento da flora láctica. Além de inibir o crescimento de micro-organismos patogênicos, o sal também possui o efeito seletivo e inibidor da flora microbiana e também controla as fermentações e a maturação dos queijos (ROCHA, 2004).

O sal é adicionado diretamente ao leite ou na massa, e pode ser utilizado a salga à seca, ou na superfície do produto, ou por imersão em salmoura. Freitas Filho (2009) e Ferreira (2011) relatam que queijos com teor de sódio inferior a 2%, possuem maior susceptibilidade à contaminação, pois o sal regula as atividades enzimáticas e diminui o crescimento de micro-

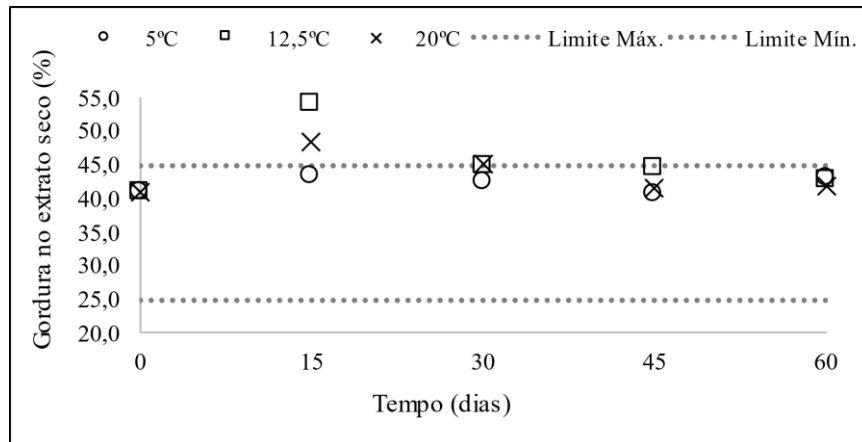
organismos. Entretanto, Figueredo (2006) relata que a quantidade recomendada para queijos deve ser de 1,5%. Pretto (2018) relata que os produtores adicionam o sal na fabricação dos queijos, conforme o seu gosto, não havendo uma padronização entre os produtores.

Então, os valores médios de NaCl do QAS encontrados por Ide *et al.*, (2001) na região serrana de Santa Catarina variaram entre 0,5% a 3,5%, os autores também explanam que esta variação se deve à falta desta padronização em sua produção. Para Tavares *et al.*, (2019), o teor de cloretos resultou em média 0,51 g NaCl/ 100g em 30 amostras de queijo colonial artesanal produzido na região Sul do Rio Grande do Sul. Freitas Filho *et al.*, (2020) verificaram o teor de cloretos (NaCl) variando entre 1,22 a 1,27 g NaCl/100g em queijo de coalho comercializado em feiras no município de Recife-PE. Louvatel e Degenhardt (2016) analisaram queijos coloniais de 6 a 13 dias de maturação e encontraram um teor médio de NaCl entre 2,64 a 6,07%.

4.5.7 Gordura no extrato seco (GES)

Quanto aos resultados de GES dos queijos estudados, após os sessenta dias de maturação nas três temperaturas de incubação, eles apresentaram conforme à legislação vigente (Figura 23). Segundo Rio Grande do Sul (2014), o queijo Serrano deve apresentar sua gordura no extrato seco entre 25% e 44,9%. Na análise do dia D:60 na temperatura de 5 °C, o GES do queijo apresentou resultado de $44,35 \pm 0,01\%$, em 12,5 °C apresentou $39,44 \pm 0,01\%$, e, por último, em 20 °C, o queijo apresentou $39,24 \pm 0,01\%$.

Figura 23: Análise da gordura no extrato seco do QAS em diferentes temperaturas (5, 12,5 e 20 °C), ao longo do tempo de maturação, considerando os seus limite máximo e mínimo, representados pela barra em (25 e 44,9 g/100 g)



Fonte: Própria (2022).

Entretanto, ao longo do experimento, houve inconformidade do resultado de GES no tempo D:15 nas temperaturas de 12,5 e 20 °C ($54,01 \pm 0,01$ e $48,35 \pm 0,01$, respectivamente) e no tempo D: 30 na temperatura de armazenamento de 20 °C ($45,05 \pm 0,01\%$). Esse resultado possui relação com a diminuição da umidade dos queijos. A quantidade de gordura no extrato seco é determinada por meio da razão entre teor de gordura e o extrato seco total do queijo.

Andrade (2006), menciona que o teor de gordura de um queijo é melhor analisado quando expresso em relação ao extrato seco total, impedindo que ocorram variações ocasionadas por uma eventual perda de umidade. Neves *et al.*, (2021) verificaram que os queijos do seu experimento apresentaram percentuais de gordura na faixa de 20,6 a 26,66%, classificados como magros e semi gordos, conforme o conteúdo de matéria gorda no extrato seco (GES). Um estudo feito na região do Serro-MG mostrou queijos com o GES variando de 37,0 a 59,0% (PINTO, 2004). No estudo de Lucas *et al.*, (2012), foi observada uma variação de GES de 32,73 a 48,78%, sendo que três amostras de queijos coloniais foram classificadas como gordos, e apenas uma delas foi classificada como semigordo.

4.6 ANÁLISES MICROBIOLÓGICAS DOS QUEIJOS

Segundo os dados do Boletim Epidemiológico de surtos de doenças transmitidas por alimentos (DTA) no Brasil, o leite e os derivados lácteos foram responsáveis por 7,29% dos surtos de DTA, entre os anos de 2009 a 2018 (BRASIL, 2019). Segundo a *Food Standards Australia New Zealand* (FSANZ, 2009), o queijo produzido com leite cru está associado a casos de DTA, associados às diversas bactérias, como a *Escherichia coli* O157:H7, a *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* spp. e *Staphylococcus aureus*. Então, a fabricação de queijos a partir de leite cru possibilita a veiculação de micro-organismos patogênicos alimentares e pode ser um risco à saúde pública.

4.6.1 *Listeria monocytogenes*

As amostras de QAS analisadas no presente trabalho, ao longo de sessenta dias de maturação, apresentaram ausência para *Listeria monocytogenes*. De acordo com Silva *et al.* (2010), cepas de *Listeria monocytogenes* são bastonetes muito pequenos e são Gram-positivos e não formam esporos, eles possuem a enzima catalase e não produzem sulfeto de hidrogênio. A maior preocupação quanto a contaminação por *Listeria*, é a forma de armazenamento e consumo dos produtos, pois, mesmo em refrigeração, ela pode resistir e até se desenvolver nos alimentos (BARANCELLI, 2020). Nota-se que a *Listeria* é potencialmente patogênica e pode causar a listeriose (SILVA *et al.*, 2010). Na indústria de alimentos, a *Listeria*, pode apresentar resistência aos desinfetantes, pois, ela possui a capacidade de formação de biofilmes, que pode contaminar o alimento que entrar em contato com a superfície contaminada, sendo que a presença de biofilmes está associada à higienização precária (KLANČNIK *et al.*, 2015).

Nesse sentido, em estudo realizado com QAS, no estado de Santa Catarina, Melo (2013) isolou e encontrou a presença de *Listeria monocytogenes* em três (2,77%) amostras analisadas, tornando os produtos impróprios para consumo. No estudo de Melo *et al.*, (2020), analisando 10 amostras de queijo coalho, comercializados na cidade de Campina Grande-Paraíba, foi verificado a presença de *Listeria monocytogenes* em 6 amostras analisadas.

Do mesmo modo, Menegol *et al.*, (2020), analisando 25 amostras de QAS produzido na Serra Gaúcha-RS, maturados em diferentes tempos (0 a 60 dias), verificaram que todas as amostras apresentaram resultado ausente para *Listeria monocytogenes*. Tavares *et al.*, (2019) verificaram conformidade (ausência de *Listeria monocytogenes*) em todas as 30 amostras de

queijo artesanal colonial, adquiridas na região Sul do estado do Rio Grande do Sul. Assim, Meier *et al.*, (2021), analisando 30 amostras de queijos artesanais obtidos em feiras, produtores e mercados varejistas do estado do Rio de Janeiro, não encontraram a presença de *Listeria monocytogenes* em nenhuma amostra.

4.6.2 *Salmonella*

As amostras de QAS, analisadas no presente trabalho, ao longo de sessenta dias de maturação, apresentaram ausência para *Salmonella*. A *Salmonella* é um conjunto de bacilos gram-negativos, não esporulados, aeróbios facultativos, catalase positiva, oxidase negativa, em geral, são móveis com flagelos peritríquios. O seu pH ótimo de crescimento está próximo da neutralidade, porém podem crescer em pH entre 4 e 9. Sua temperatura de crescimento está entre 7 °C e 47 °C, sendo a ótima entre 35 °C e 37 °C e a sua *Aw* mínima para crescimento de 0,94 (JAY, 2005).

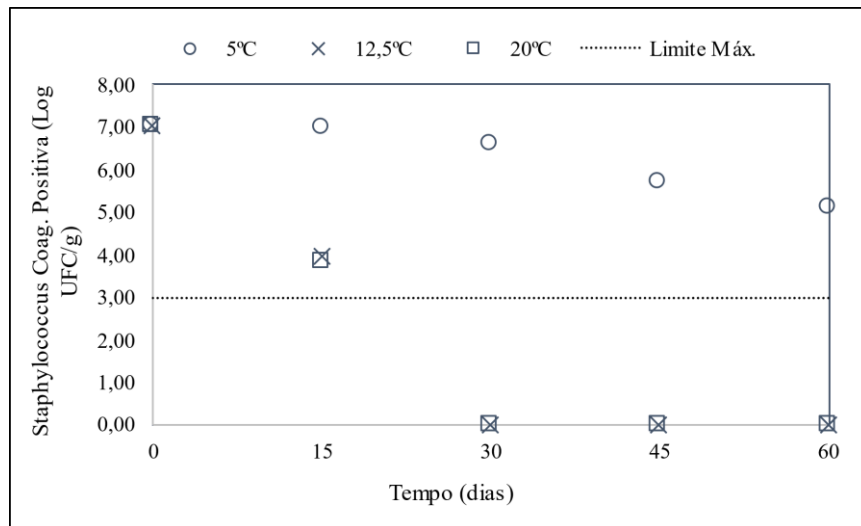
Menegol *et al.*, (2020), analisando 25 amostras de QAS produzido na Serra Gaúcha-RS, maturados em diferentes tempos (0 a 10 dias; 20 a 30 dias; 45 a 60 dias), verificaram que duas amostras apresentaram a presença de *Salmonella* no início de sua maturação amostra 1 (\leq 10 dias de maturação), e amostra 2 (entre 20 e 30 dias de maturação). No estudo de Melo *et al.*, (2021), foi verificada a presença de cepas características de *Salmonella* spp. em 6 amostras (60%). Nesse sentido, Pereira *et al.*, (2017) verificaram a ausência de *Salmonella* em todas as amostras de queijos de coalho produzidos artesanalmente, por sete queijarias artesanais no município de São Rafael-RN. Concordando com o autor, Camargo *et al.*, (2020) em seus estudos, também não observaram esta bactéria em cinco amostras analisadas de queijo-de-minas vendidos em Fernandópolis-SP.

4.6.3 *Staphylococcus coagulase positiva*

Na Figura 24, pode-se verificar que houve uma elevada contaminação inicial de *Staphylococcus* Coagulase Positiva no dia de sua fabricação (D:0), 7,01 Log UFC/g. Os queijos maturados na temperatura de 5 °C, ainda apresentaram inconformidade a este parâmetro no último dia de maturação (D:60), considerado impróprio para o consumo, resultando em 5,11 Log UFC/g. Na temperatura de 12,5 °C e 20 °C, o QAS ainda apresentou não conforme no

tempo D:15 (3,98 e 3,81 Log UFC/g, respectivamente) e após as demais análises, não houve mais o crescimento desses micro-organismos.

Figura 24: Análise de *Staphylococcus* Coagulase Positiva do QAS em diferentes temperaturas (5, 12,5 e 20 °C), ao longo do tempo de maturação, considerando o seu limite máximo representado pela barra em (3 Log UFC/g).



Fonte: Própria (2022).

A contaminação de *Staphylococcus* Coagulase Positiva, elevada no primeiro dia da fabricação dos queijos, revela que houve contaminação cruzada durante a sua fabricação. Isso porque analisando a contagem de micro-organismos do leite pela análise de contagem padrão em placas (CPP) (<8.000 UFC/mL), indica uma baixa contagem de patógenos, segundo a legislação brasileira (BRASIL, 2018) (sendo de <300.000 UFC/mL), não tendo origem desta matéria-prima, mas de algum contaminante após a ordenha do leite, ou hora da manipulação, ou processamento do queijo na agroindústria.

Os *Staphylococcus* são cocos Gram-positivos, anaeróbios facultativos, catalase positiva, imóveis, oxidase-negativa e não formam esporos. Eles se encontram amplamente distribuídos mundialmente, na pele de animais e de humanos, sendo encontrados em membranas mucosas do trato respiratório superior e urogenital inferior, bem como de modo transitório no trato digestivo, sendo relativamente estáveis no meio ambiente (QUINN *et al.*, 2005). O gênero *Staphylococcus* se divide, então, conforme a síntese ou não da enzima coagulase, sendo a sua produção correlacionada com a patogenicidade (QUINN *et al.*, 2005).

O *Staphylococcus aureus* é a espécie de maior interesse para a microbiologia de alimentos, por provocar intoxicações de origem alimentar. São bastante frequentes em nosso

meio, principalmente nas épocas quentes do ano (GAVA *et al.*, 2008); eles apresentam crescimento na faixa de 7 °C a 47,8 °C. Eles ainda suportam variação de pH entre 4 a 9,8.

As contagens altas de *Staphylococcus aureus* são as principais não conformidades encontradas nos queijos artesanais brasileiros. Menegol *et al.* (2020), analisando 25 amostras de QAS produzido na Serra Gaúcha-RS, maturados em diferentes tempos (0 a 10 dias; 20 a 30 dias; 45 a 60 dias), verificaram que todas as amostras apresentaram resultado superior que a legislação brasileira (máximo 10³ UFC/g) (1,6 × 10⁵, 2,7 × 10⁵, 1,6 × 10⁴, respectivamente). Entretanto, verificamos que houve uma redução de 10 vezes nos queijos maturados entre a 45 a 60, em comparação com os maturados de 0 a 10 dias. No estudo de Pereira *et al.*, (2017), foi verificado que em todas as sete amostras apresentaram resultados acima do limite máximo da legislação para SCP. Nesse sentido, Tavares *et al.*, (2019) verificaram que 24 (80%) apresentaram contagens de *Staphylococcus* coagulase positiva acima do permitido, em seu experimento. Na mesma linha, no estudo de Melo *et al.*, (2020), verificou que não houve crescimento de SCP.

4.6.4 Enterotoxinas estafilocócicas

As amostras de QAS analisadas neste trabalho, ao longo de sessenta dias de maturação, apresentaram ausência para enterotoxinas estafilocócicas. As enterotoxinas estafilocócicas são resultantes da expressão dos genes codificadores e são importantes exotoxinas sintetizadas por *Staphylococcus aureus*, ao longo da fase de crescimento logarítmica ou na sua fase enterotoxinas estafilocócicas. A legislação brasileira, através da IN 60 (BRASIL, 2019), incluiu a análise de enterotoxinas estafilocócicas em queijos somente nesta atualização da legislação, não estando presente na extinta RDC 12 (BRASIL, 2001).

As enterotoxinas podem ser produzidas a partir de estafilococos isolados de humanos, indicando que as DTAs podem, indiretamente, ser ocasionadas pelos manipuladores de alimentos (CARMO *et al.*, 2002). A temperatura ótima para a produção de enterotoxinas estafilocócicas é de 37 °C, tendo seu pH neutro (ótimo entre 6,5 a 7,5), uma alta atividade de água (ótimo a 0,99), condições atmosféricas (aeróbicas e anaeróbicas) e microbiota concorrente (geralmente, só há produção de enterotoxina quando há contaminação). Segundo Silva *et al.*, (2010), para a produção de enterotoxina, a população necessária de *S. aureus* no alimento é de 10⁶ UFC/g, que corresponde a ingestão de uma dose menor que 1 µg. Essas toxinas são formadas por cadeias de proteínas simples e de baixo peso molecular de 26.000 a 30.000 daltons

(SORIANO *et al.*, 2002). Elas são resistentes ao processo de pasteurização e não são inativadas pelos produtos originados da fermentação de outros micro-organismos (LONCAREVIC *et al.*, 2005), onde uma vez produzida, permanece no alimento mantendo sua atividade biológica (BECKER *et al.*, 2007).

Carmo *et al.*, (2002) identificaram que amostras de queijo Minas artesanais, no Brasil, apresentavam linhagens *S. aureus* produtoras de enterotoxinas, o que foi relatado como um alerta para saúde pública. Nunes *et al.*, (2016) constataram presença de estafilococos coagulase negativos, produtores de enterotoxinas, em queijos minas frescal comercializados no Sudeste do Brasil, reforçando o risco de intoxicação alimentar por *Staphylococcus* sp., neste produto.

4.6.5 *Escherichia coli* (E. Coli)

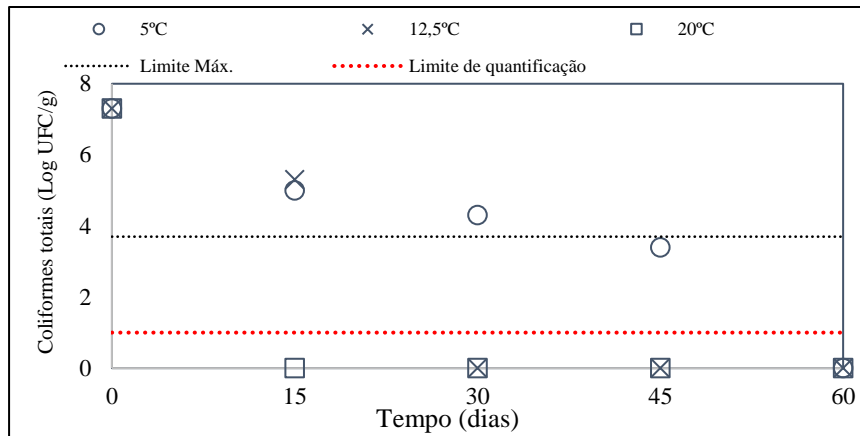
As amostras de QAS, analisadas no presente trabalho, ao longo de sessenta dias de maturação apresentaram ausência para *Escherichia coli*. A *E. coli* está presente no trato intestinal de animais de sangue quente, incluindo o ser humano, em que há uma estratégia nutricional comensal, ou seja, sem causar doenças. Elas se caracterizam como um dos principais contaminantes do leite cru, quando o processo de obtenção não respeita critérios mínimos de higiene (DRUMOND *et al.*, 2018). No entanto, em queijos contaminados, segundo Martins (2006), um dos principais defeitos causados por esse grupo de bactérias, é o seu estufamento precoce, sendo que queijos com muitas olhaduras e irregulares na massa demonstram a característica típica desse contaminante.

Menegol *et al.*, (2020), analisando 25 amostras de QAS produzido na Serra Gaúcha-RS, maturados em diferentes tempos, verificaram a presença de *E. coli*, em 53,84% das amostras. Melo *et al.*, (2013) verificaram valores de *E. coli* acima do padrão máximo da legislação de 36,11%, analisando QAS. Pontarolo (2014) analisou QAS de diferentes propriedades e estruturas diferentes de produção e verificou a presença de *E. coli* de 46,77%, constatado baixa padronização em ambas as propriedades. Dalmina (2018), analisando o QAS, verificou que 32,89% das amostras ao longo da maturação estavam não conformes para *E. coli*, sendo que aos 14 e 21 dias de maturação, havia 10 amostras não conformes, e após 28 e 35 dias, as amostras não conformes totalizavam 8 e 9, tendo uma diminuição de amostras não conformes.

4.6.6 Coliformes totais e termotolerantes

Nas Figuras 25 e 26, pode-se verificar as contagens de coliformes totais e termotolerantes realizadas no experimento.

Figura 25: Análise de coliformes totais do QAS em diferentes temperaturas (5, 12,5 e 20 °C), ao longo do tempo de maturação, considerando o seu limite máximo na legislação representado pela barra em (2 Log UFC/g) de acordo com Brasil (1996) *.



*Limite mínimo de quantificação do micro-organismo no laboratório em que foi realizado.

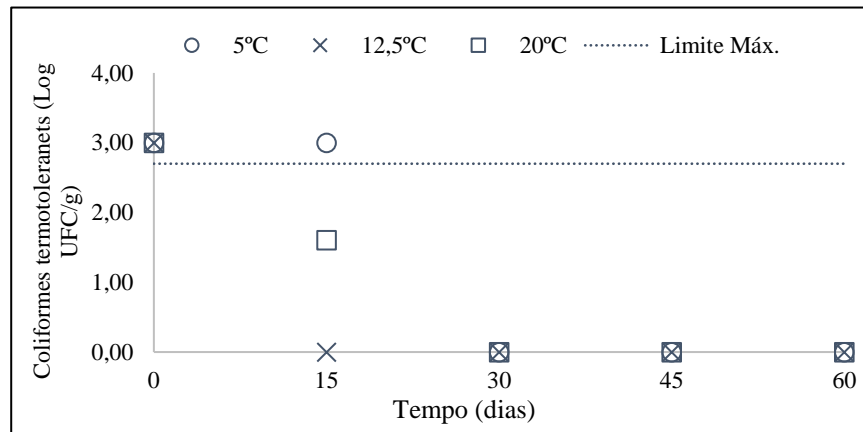
Fonte: Própria (2022).

Quanto às contagens de coliformes totais do queijo analisado, pode-se verificar que no dia D:0, o queijo apresentou uma contagem acima do padrão máximo da legislação brasileira, resultando em 7 Log UFC/g, e após as demais análises, houve um decréscimo em seu estado. O queijo maturado na temperatura de 5 °C possuiu inconformidade até a sua análise de maturação D:30 e após isto, apresentou-se conforme à legislação brasileira, sendo de 4 Log UFC/g (BRASIL, 1996). Porém, entre as demais temperaturas, foi a que mais demorou para apresentar-se em conformidade. Não houve crescimento destes micro-organismos nas temperaturas de 12,5 °C e 20 °C após o tempo D:30, estando em conformidade para o seu consumo após este período de maturação.

Os coliformes totais são micro-organismos indicadores que fazem parte de um grupo específico de bactérias da família *Enterobacteriaceae* e utilizam a lactose, enquanto outras enterobactérias utilizam apenas a glicose. A fermentação da lactose resulta na formação de gás e ácido, produtos essenciais para identificar esses indicadores. A temperatura de 30 °C indica a de incubação, porém não é uma regra, algumas metodologias recomendam de 35 a 37 °C. Essa determinação dos coliformes a 30 °C tem o objetivo de diferenciá-los dos coliformes termotolerantes, ou seja, os que crescem a incubação de 45 °C e estão diretamente relacionados à contaminação de origem fecal (BELOTI *et al.*, 2015). Estes micro-organismos estão presentes

na água, sendo presentes no ambiente da ordenha e na indústria. Estão presentes ainda em abundância na natureza, em alimentos crus, porém eles são sensíveis à temperatura.

Figura 26: Análise de coliformes termotolerantes do QAS em diferentes temperaturas (5, 12,5 e 20 °C), ao longo do tempo de maturação, considerando o seu limite máximo representado pela barra em (3 Log UFC/g), de acordo com Brasil (1996).



Fonte: Própria (2022).

Quanto às contagens de coliformes termotolerantes, na análise D:0, o queijo apresentou-se não conforme com a legislação brasileira, sendo de no máximo 2,70 Log UFC/g (BRASIL, 1996), apresentando-se em 3 Log UFC/g. Entretanto, na análise do dia D:15, os queijos maturados nas temperaturas de 12,5 e 20 °C não apresentaram a presença destes contaminantes, porém ainda houve a inconformidade no queijo maturado em 5 °C na análise do dia D:15.

A presença de coliformes nos queijos podem causar defeitos levando à sua deterioração como o seu estufamento precoce, alterando seu formato e sabor (GUEDES NETO, 2004) e segundo o autor McSweeney (2007), este estufamento torna-se visível quando esta contagem atinge valores de cerca de 100 a 400 coliformes/g. Segundo Araújo (2016), esta presença nos alimentos pode indicar que seu processamento foi inadequado ou há a sua recontaminação no pós-processamento, sendo que as causas mais frequentes de sua presença, são oriundas do leite contaminado, dos equipamentos mal higienizados ou da manipulação inadequada. Segundo Souza *et al.*, (2003), os altos níveis de coliformes totais e termotolerantes podem ser a principal causa para a formação de “buracos” no QAS.

Menegol *et al.*, (2020), analisando 25 amostras de QAS produzido na Serra Gaúcha-RS, maturados em diferentes tempos, verificaram altas contagens de coliformes termotolerantes (> 1100 NMP/g), em todas as amostras analisadas. Enquanto Dalmina (2018) verificou

resultados não conformes de coliformes totais em amostras de QAS ao longo de sua maturação, diminuídos ao longo de sua maturação, a autora sugere que a sua presença pode estar ligada aos utensílios utilizados na fabricação dos queijos, de inox ou de madeira, nas diferentes propriedades avaliadas. Souza *et al.*, (2003) explana que existe uma correlação entre as contagens de coliformes totais e o teor de umidade de seu estudo. Esses parâmetros influenciam esta população no verão (em temperaturas mais elevadas), assim como neste trabalho, sendo que o QAS maturado na temperatura mais elevada (20 °C) (Figura 5) tiveram influência benéfica na diminuição de coliformes totais e termotolerantes. Segundo Beloti *et al.*, (2015), os coliformes termotolerantes (à 45 °C) são os mesmos coliformes totais que continuam a fermentar a lactose com produção de gás ao serem incubados à 45 °C e indicam a segurança de consumo dos alimentos, dos indicadores, eles são os mais importantes. Isso porque eles conseguem sobreviver no intestino humano e animal, explicando assim, o porquê que a presença nos alimentos tem origem fecal. Esse grupo é composto por 4 gêneros: *E. coli*, *Enterobacter*, *Citrobacter* e *Klebsiella*, porém, apenas a *E. Coli* faz do intestino humano e animal seu habitat natural (BELOTI *et al.*, 2015).

4.7 CORRELAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA E MICROBIOLÓGICA DO QAS, DURANTE A SUA MATURAÇÃO

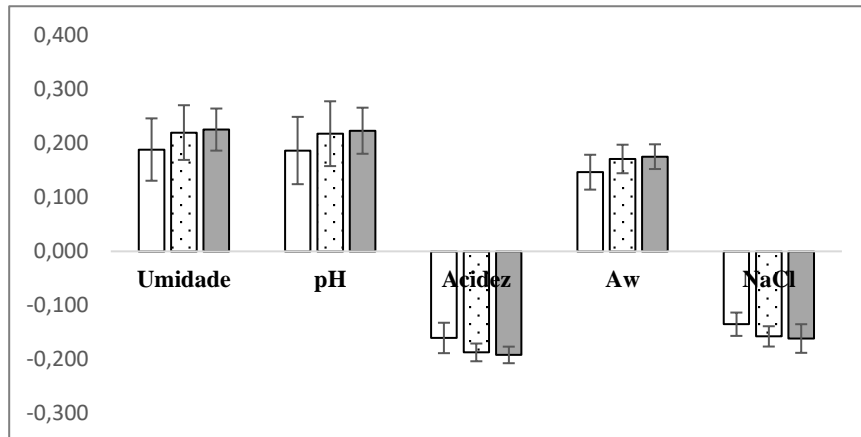
A redução populacional de bactérias transmitidas por alimentos durante a maturação do QAS foi avaliada, e os resultados mostraram que os queijos estavam seguros e em conformidade quanto à presença de *Salmonella* spp., *Escherichia coli* e *Listeria monocytogenes* durante o seu período de maturação, embora não seja raro encontrar esses micro-organismos em produtos lácteos artesanais (MENEGOL *et al.*, 2020). Entretanto, houve a detecção de SCP, coliformes totais, coliformes termotolerantes durante a maturação dos queijos, como apresentado (Figuras 34, 35 e 36).

Os resultados mostram que a inativação das bactérias depende da temperatura da exposição do QAS durante a sua maturação, como também indicam que os parâmetros físico-químicos desempenham um papel importante. O Gráfico 1 mostra a correlação de Pearson r -valores entre os micro-organismos coliformes termotolerantes, coliformes totais, SCP e os parâmetros físico-químicos, durante a sua maturação de todos os dados experimentais.

Os resultados mostram relação positiva entre umidade, A_w e pH e crescimento de bactérias e relação negativa com concentração de NaCl e da acidez. A população de coliformes

termotolerantes foi impactada significativamente ($p \leq 0,05$) pelos parâmetros de umidade e pH, enquanto isso, há os coliformes totais e SCP por umidade e acidez ($p \leq 0,05$). A concentração de A_w e NaCl não impactou significativamente ($p > 0,05$) as bactérias patogênicas.

Gráfico 1: Resultados do PLS para influência de parâmetros físico-químicos em coliformes termotolerantes (barras brancas), coliformes totais (barras pontilhadas) e *Staphylococcus coagulase positiva* (barras cinzas) crescimento populacional.



Fonte: Própria (2022).

A avaliação do impacto de diferentes parâmetros sobre características de matrizes alimentares complexas por “abordagem única por vez” convencional e avaliação estatística convencional, pode levar a uma análise crítica e ignorar a importância da interação dos parâmetros de processo. A análise multivariada é particularmente adequada para resolver problemas analíticos na indústria alimentícia, quando os efeitos das variáveis de processamento em um produto complexo estão envolvidos (PAN *et al.*, 2002).

O Gráfico 1 mostra os resultados de regressão do PLS e contribui para a discussão dos principais parâmetros de impacto na contagem de bactérias. Valores positivos indicam que o aumento do parâmetro influencia positivamente no crescimento populacional de bactérias e valores negativos implicam em aumentar o valor do parâmetro físico-químico influencia a inativação delas. O tamanho das colunas representa a influência, que pode ser positiva ou negativa do atributo no grupo de bactérias patogênicas. As linhas verticais representam um intervalo de 95% de confiança, cruzando x-eixo, e o parâmetro correspondente não tem influência no crescimento do micro-organismo. Para obter um modelo de regressão bem-sucedido, r^2X e R^2Y tiveram que ser iguais ou superiores a 0,70. A capacidade de prever novas amostras foi avaliada pelo Q^2 , que deve ser igual ou superior a 0,50 (NOKELS *et al.*, 2010).

A Tabela 6 apresenta os parâmetros estatísticos de montagem para o modelo de regressão feitos a partir da técnica PLS, que apresentou boa adequação aos dados experimentais. A análise global do grupo de três bactérias (*Staphylococcus* coagulase positiva e coliformes totais e termotolerantes) mostrou q²-valor de 0,68 e R²Y e R²X de 0,71 e 0,83, respectivamente.

Tabela 6: r-valores de correlação entre bactérias transmitidas por alimentos nos parâmetros físico-químicos do SAC e do queijo, durante a sua maturação.

Micro-organismos	Umidade	Aw	pH	Acidez	NaCl
Coliformes termotolerantes	0,84*	0,58	0,81*	-0,62	-0,52
Coliformes totais	0,89*	0,72	0,91*	-0,79*	-0,64
<i>Staphylococcus</i> coagulase positiva	0,91*	0,74	0,89*	-0,83*	-0,71

* correlação estatisticamente significante($p < 0,05$).

Fonte: Própria (2022).

O impacto da umidade, pH, acidez, Aw e NaCl são representados pelos coeficientes padronizados, mostrados na Tabela 6. Os valores positivos do coeficiente padrão indicam relação positiva entre os resultados, o que significa que valores mais elevados de umidade e pH levam a maior população de bactérias. Os parâmetros físico-químicos apresentaram efeito semelhante nas três bactérias, embora a umidade e o pH tenham se mostrado ligeiramente mais importantes que as outros. Os coeficientes padronizados de umidade estavam na faixa de 0,19-0,23; de pH na faixa de 0,19-0,22; a acidez variou entre -0,16 e -0,19; de Aw variou de 0,15 a 0,18; e para concentração de NaCl entre -0,14 e -0,18. Portanto, os resultados mostram que a inativação dos micro-organismos no QAS não são uma consequência de um único efeito inibitório, mas sim da combinação de vários fatores.

4.8 ANÁLISE METAGENÔMICA (NGS) (BACTÉRIAS)

Um total de 338.696 *reads* foram sequenciados usando a tecnologia NGS para identificação de bactérias (região 16S do genoma), onde a maior abundância de bactérias, após o seu tratamento dos dados, ocorreu no tempo D:30 (45.674 *reads*) na temperatura de 5 °C e a menor abundância ocorreu no QAS maturado no tempo D:60, temperatura em 20 °C (6.106 *reads*). Comparando o tempo D:0 e o D:30 na temperatura de 5 °C, não houve grandes diferenças entre as suas abundâncias. Pode-se verificar a classificação biológica das bactérias totais nas amostras de QAS, em diferentes temperaturas no anexo C.

Foram identificados dois filos nas amostras analisadas, o filo Firmicutes e o Proteobacteria. O filo Firmicutes possuiu uma taxonomia total 295.571 *reads*, sendo que a maior abundância deste ocorreu no tempo D:0 (40.411 *reads*) e a menor ocorreu no tempo D:60 em 20 °C de maturação (6.099 *reads*), sendo identificado em todos os tempos e temperaturas do experimento. O que resultou em uma maior abundância, em comparação com o outro filo encontrado. O filo Proteobacteria possuiu uma taxonomia total 43.122 *reads*, identificado com maior abundância no tempo D:15 na temperatura de 20 °C (10.113 *reads*) e em menor, no tempo D:60 na temperatura de 12,5 °C (1 *reads*), não sendo identificado nos tempos D:15 e D:30 na temperatura de maturação de 20 °C.

Ao longo do experimento, foram encontradas quatro classes. A classe Bacilli (taxonomia total 295.566 *reads*) foi identificada em todos os tempos e temperaturas do ensaio, possuindo a sua maior abundância no tempo D:0 (40.411 *reads*), e a menor, no tempo D:60 na temperatura de 20 °C (6.099 *reads*). A classe Gammaproteobacteria apresentou uma taxonomia total de 43.113 *reads*, sendo que a sua maior abundância foi identificada no tempo D:15 na temperatura de 20 °C (10.113 *reads*), e a menor no tempo D:45 em 12,5 °C (1 *reads*), não sendo identificada na temperatura de 20 °C tempos (D:30; D:45 e D:60). As classes Epsilonproteobacteria e Clostridia possuíram abundâncias muito baixas, em comparação com as demais classes identificadas (9 e 5 *reads*, respectivamente).

As bactérias pertencem a cinco ordens (taxonomia total: 338.693 *reads*) (Anexo C). A ordem Lactobacillales possuiu uma taxonomia total de 286.460 *reads*, a maior abundância foi identificada na amostra do tempo D:0 (39.507 *reads*), e a menor no tempo D:60 em 20 °C (6.099 *reads*). A ordem Enterobacteriales obteve uma taxonomia total de 42.121 *reads*, possuindo maior abundância no tempo D:15 em 20 °C (9.914 *reads*), e a menor no tempo D:60 em 12,5 °C com somente 1 *reads*. Os Bacillales apresentaram uma taxonomia total de

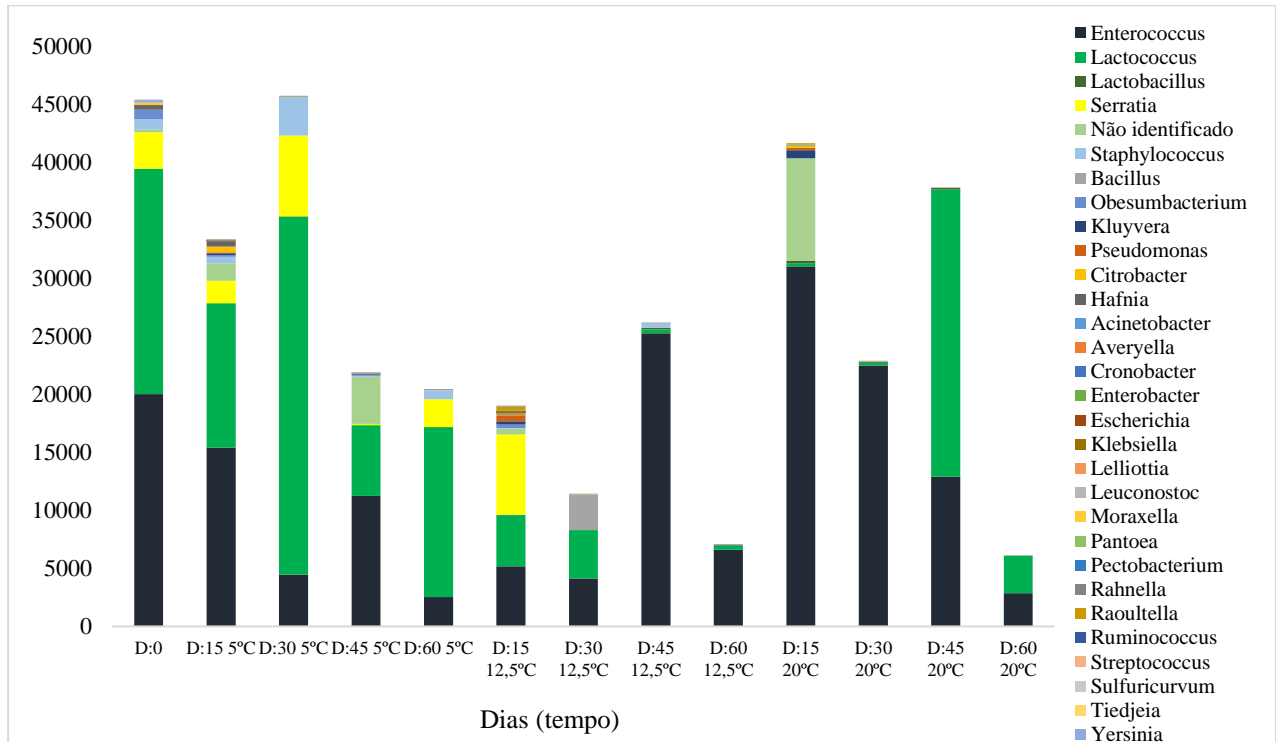
9.106 *reads*, possuindo a sua maior abundância no tempo D:30 em 12,5 °C (3.001 *reads*), e a menor no tempo D:45 em 20 °C (3 *reads*). A ordem Pseudomonadales possuiu taxonomia total de 992 *reads*, no tempo D:15 em 12,5 °C (532 *reads*), e a menor no tempo D:45 em 20 °C (2 *reads*). Já as ordens Campylobacterales e clostridiales possuíram pouca abundância cada, (9 e 5 *reads*, respectivamente).

Quanto à classificação das bactérias por suas famílias, obteve-se a presença de 12 famílias de bactérias ao longo do experimento (taxonomia total 338.693 *reads*), sendo elas: *Enterococcaceae* (164.016 *reads*); *Streptococcaceae* (121.303 *reads*); *Enterobacteriaceae* (42.000 *reads*); *Staphylococcaceae* (6.134 *reads*); *Bacillaceae* (2.972 *reads*); *Pseudomonadaceae* (789 *reads*); *Lactobacillaceae* (661 *reads*); *Leuconostocaceae* (480 *reads*); *Moraxellaceae* (203 *reads*); *Erwiniaceae* (121 *reads*); *Helicobacteraceae* (9 *reads*) e a família das *Ruminococcaceae* (5 *reads*). As famílias *Enterococcaceae*, *Leuconostocaceae* e *Streptococcaceae* foram identificadas no experimento em todos os tempos e temperaturas.

Houve à presença de 30 gêneros de bactérias presentes ao longo da maturação do QAS (Anexo C) (taxonomia total 338.693 *reads*): *Enterococcus* (164.016 *reads*); *Lactococcus* (121.189 *reads*); *Serratia* (21.478 *reads*); unidentified (não identificado) (15.119 *reads*); *Staphylococcus* (6.134 *reads*); *Bacillus* (2.972 *reads*); *Obesumbacterium* (1.352 *reads*); *Kluyvera* (1.213 *reads*); *Hafnia* (995 *reads*); *Pseudomonas* (789 *reads*); *Citrobacter* (718 *reads*); *Lactobacillus* (661 *reads*); *Leuconostoc* (480 *reads*); *Raoultella* (459 *reads*); *Yersinia* (273 *reads*); *Moraxella* (149 *reads*); *Klebsiella* (124 *reads*); *Pantoea* (121 *reads*); *Streptococcus* (114 *reads*); *Rahnella* (83 *reads*); *Cronobacter* (69 *reads*); *Acinetobacter* (54 *reads*); *Enterobacter* (46 *reads*); *Pectobacterium* (28 *reads*); *Averyella* (19 *reads*); *Lelliottia* (10 *reads*); *Sulfuricurvum* (9 *reads*); *Escherichia* (8 *reads*); *Tiedjeia* (6 *reads*) e por fim o *Ruminococcus* (5 *reads*).

Abaixo, no Gráfico 2, pode-se verificar a abundância dos gêneros bacterianos nas três temperaturas de maturação do QAS (5, 12,5 e 20 °C), ao longo de sua maturação.

Gráfico 2: Taxonomia dos gêneros bacterianos (*reads*) identificados durante a maturação do QAS (exibição pela sua quantidade).



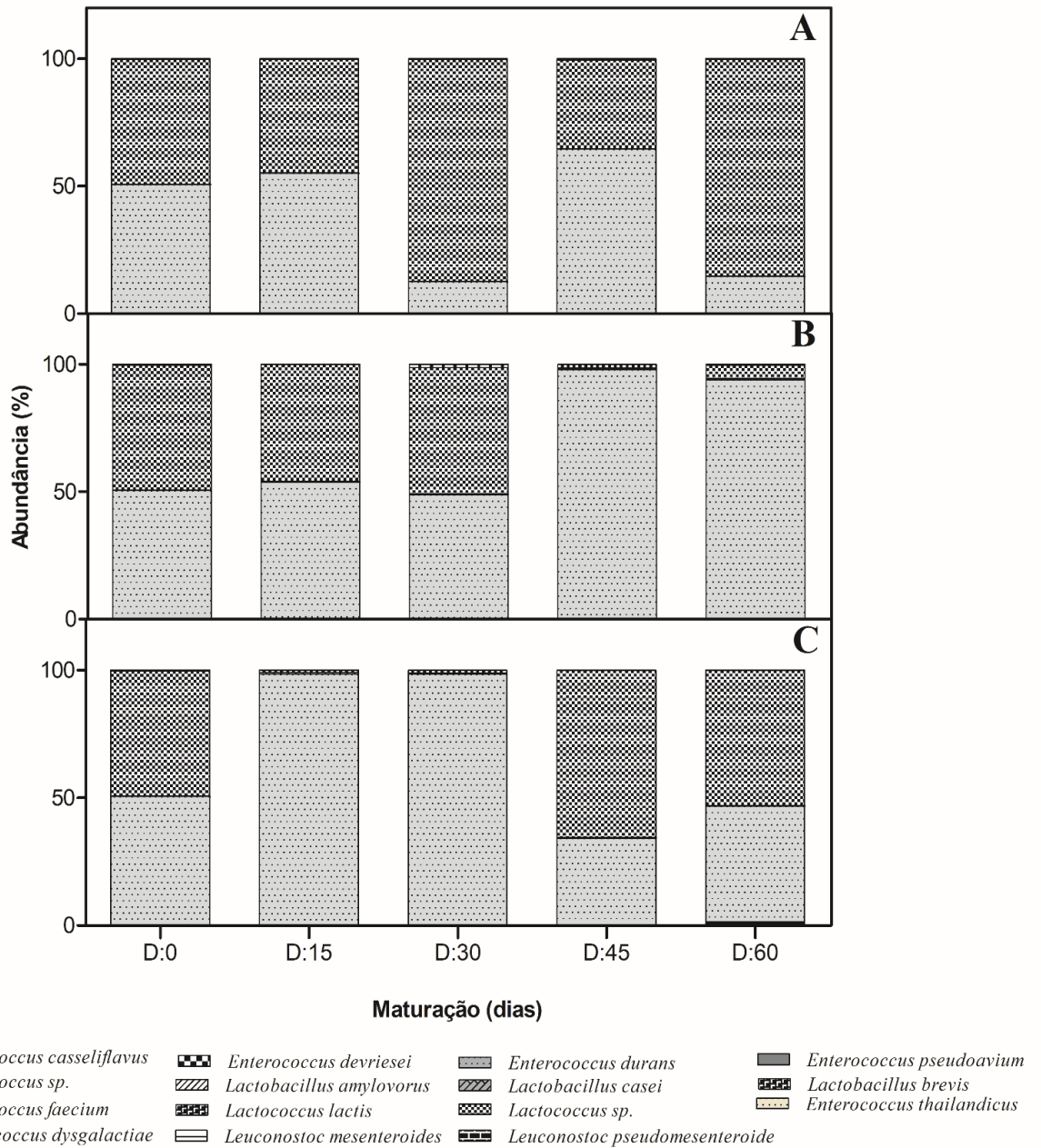
Fonte: Própria (2022).

Foram identificadas 60 espécies de bactérias nas amostras de QAS, ao longo de sua maturação, sendo elas divididas entre as BAL (item 4.8.1) e as patogênicas (item 4.8.2), como pode-se verificar, abaixo:

4.9 TAXONOMIA DAS ESPÉCIES DE BAL DO QAS AO LONGO DE SUA MATURAÇÃO

Segundo Jay *et al.* 2005; Forsythe, 2013; Mahony *et al.*, 2014, as BAL são compostas por 13 gêneros de bactérias Gram-positivas, sendo elas: *Carnobacterium*, *Oenococcus*, *Enterococcus*, *Pediococcus*, *Lactococcus*, *ParaLactobacillus*, *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Lactospaera*, *Tetragenococcus*, *Leuconostoc*, *Vagococcus*, *Weissella*). Na Figura 27, pode-se verificar as espécies de BAL identificadas no QAS, ao longo de sua maturação.

Figura 27: Taxonomia das espécies de BAL encontradas durante a maturação do QAS (exibição pela sua diversidade)*



*Nota: Quadro A: QAS maturado na temperatura de 5 °C; quadro B: QAS maturado em temperatura de 12,5 °C e quadro C: QAS maturado a 20 °C.

Fonte: Própria (2022).

Conforme a Figura 37, pode-se verificar que há dois gêneros que possuíram uma maior predominância nas amostras de QAS, durante a sua maturação, sendo os gêneros *Lactococcus* e *Enterococcus*. Eles se alternam a sua abundância, ao longo do tempo de maturação nas três temperaturas de maturação avaliadas. Conforme a Figura 37 (b), observa-se que a população de *Lactococcus* sp. reduz consideravelmente a partir de 30 dias de maturação (D:30). Entretanto, a população de *Lactococcus* sp. aumenta a partir desta redução do gênero citado.

Durante os 30 primeiros dias (D:30) de maturação, verifica-se um aumento considerável de *Enterococcus* sp. e a redução de *Lactococcus* sp. a partir de 45 dias (D:45), o grupo de *Enterococcus* reduz e ocorre novamente o aumento dos *Lactococcus* sp.

A espécie *Lactococcus casei* foi detectada a partir de 15 dias de maturação (D:15), com uma redução após o tempo D:60, sendo que esta espécie esteve mais evidente nas temperaturas de 12,5 e 20 °C, com maior população nesta última.

Na temperatura de maturação de 20 °C, no tempo D:15, observa-se uma maior abundância de *Enterococcus* sp., este gênero predominou nas amostras. Após 30 dias de maturação (D:30) na temperatura de 5 °C, verifica-se uma maior abundância do gênero *Lactococcus* sp. Na temperatura de 20 °C, os *Enterococcus* são mais abundantes, por fim, na temperatura de 12,5 °C, estes dois grupos são similares. Na análise D:45, houve a alternância entre estes dois gêneros em todas as temperaturas de maturação. Ainda pode-se analisar que os queijos maturados na temperatura de 5 °C possuem menor diversidade de grupos de bactérias lácticas presentes ao longo do experimento.

Segundo Souza *et al.*, (2003), o gênero *Enterococcus* aumenta a sua abundância em número no final do processo de maturação, o que foi semelhante no tempo D:45 e D:60 na temperatura de maturação de 12,5 °C e no tempo D:60 na temperatura de 20 °C.

Os *Lactococcus* são cocos Gram-positivos dispostos em pares ou curtas cadeias e apresentam formato ovóide, com cerca de 0,5 a 1,5 µm de comprimento, catalase negativa, oxidase negativa, com temperatura ótima de crescimento em 30 °C. Estes micro-organismos podem crescer a 10 °C e não crescem em caldo com pH ajustado a 9,6 ou em caldo contendo 6,5% de NaCl e possuem requerimento de oxigênio facultativo. Enquanto isso, não produzem esporos, não apresentam motilidade e possuem metabolismo homolático, onde o ácido lático é o único ou principal produto resultante da fermentação da glicose (MADIGAN *et al.*, 2005).

Devido às suas propriedades tecnológicas, os *Lactococcus* são muito utilizados na indústria de produtos lácteos, na produção de queijos e coalhada, tendo como principal função o desenvolvimento de atividades acidificantes e proteolíticas, e, conseqüentemente, de textura, sabor e aroma, além de atuar como bioconservadores, por meio da produção de compostos

antimicrobianos, como os ácidos orgânicos e bacteriocinas (CASALTA *et al.*, 2008). Diversos trabalhos relatam que algumas cepas bacteriocinogênicas de *Lactococcus* apresentaram atividade antimicrobiana contra patógenos alimentares, como o caso da *Listeria monocytogenes* (COSENTINO *et al.*, 2012; HELLAL *et al.*, 2012).

As bactérias concorrem pelos recursos disponíveis no meio em que estão, então, quando uma população aumenta, concorre com as demais bactérias presentes, ou seja, não sabemos se uma população aumentou ou se a outra que diminuiu e gerou espaço. Contudo, não se pode esperar uma relação direta observando somente um grupo específico de bactérias, pois o seu universo é imenso para a conclusão observando somente um grupo específico.

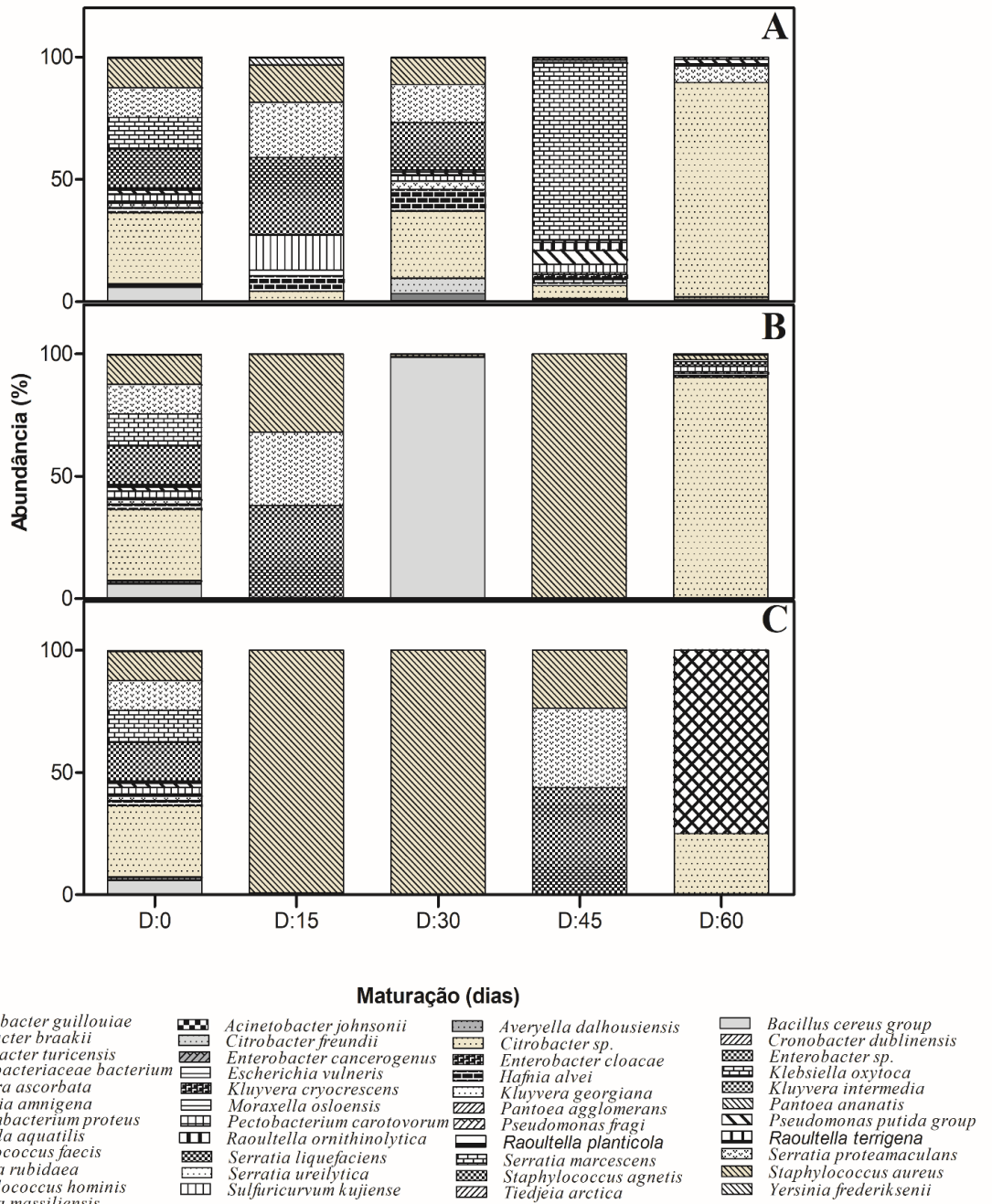
Os *Enterococcus* são BAL Gram-positivas e catalase negativa e são frequentemente isolados em queijos artesanais produzidos com leite cru. A presença destes micro-organismos em queijos artesanais, contribuem em sua textura, sabor e aroma, devido à produção de compostos aromáticos, sendo que estes micro-organismos são produtores de enterocinas, que possuem grande espectro de inibição a diferentes patógenos, como *Listeria spp.* e *Clostridium spp.* (GIRAFÁ, 1997). Os *Enterococcus* podem ocorrer sob a forma de cocos isolados, em pares, ou em cadeias curtas, não esporulam, são oxidase negativo e anaeróbio facultativos. Os *Enterococcus* crescem em uma temperatura ótima de 35 °C, entretanto, a maioria das espécies deste gênero cresçam em temperaturas que variam de 10 a 45 °C, sendo que a maioria destes micro-organismos apresentam crescimento em altas concentrações de NaCl (até 6,5%), pH em torno de 9,6 e ainda pode sobreviver a 60 °C durante 30 min, sendo, portanto, termodúricos. Segundo Foulque Moreno *et al.*, (2006), uma abundância maior de *Enterococcus* durante a fase final de maturação do queijo, pode ser devido à sua tolerância a uma ampla gama de condições ambientais.

Abaixo, pode-se verificar os gêneros das bactérias lácticas identificadas nas amostras de QAS com algumas de suas características mais importantes, bem como, onde eles já foram identificados anteriormente em alimentos, e em outros ambientes diversos. Pode-se verificar a Tabela com a classificação biológica das bactérias ácido lácticas nas amostras de QAS em diferentes temperaturas no anexo D.

4.10 TAXONOMIA DAS ESPÉCIES DE BACTÉRIAS PATOGÊNICAS DO QAS, AO LONGO DE SUA MATURAÇÃO

Na Figura 28, pode-se identificar as bactérias patogênicas identificadas ao longo da maturação do QAS do experimento.

Figura 28: Taxonomia das espécies de bactérias patogênicas encontradas durante a maturação do QAS (exibição pela sua diversidade) *.



Nota: Quadro A: QAS maturado na temperatura de 5 °C; quadro B: QAS maturado em temperatura de 12,5 °C e quadro C: QAS maturado a 20 °C.

Fonte: (Própria, 2022).

Pode-se verificar na Figura 28 (a), que em todos os tempos de maturação foram identificadas a presença da família *Enterobacteriaceae*, sendo que no tempo D:60, há a sua maior abundância e a diminuição das demais espécies presentes anteriormente. Verificamos também, na Figura 28 (a), que quanto maior o tempo de maturação menos é identificada a presença de bactérias patogênicas, tendo em evidência este aumento nos tempos D:15 e no tempo D:45. No tempo D:30, na temperatura de 12,5 °C, há uma maior predominância do grupo *Bacillus cereus*.

Na temperatura de maturação de 20 °C (Figura 28 (c)), houve a presença da espécie *Staphylococcus aureus* em todas as temperaturas analisadas, entretanto, nos tempos D:15 e D:30 esta espécie possui a maior abundância entre as demais encontradas, sendo que após esse período, outros micro-organismos estão presentes e a sua abundância diminui.

Chama a atenção a grande abundância da espécie *Ruminococcus faecis* no tempo D:60, em 20 °C. É importante enfatizar também que na temperatura de maturação de 20 °C, ocorreu a menor diversidade de grupos de espécies de bactérias de importância clínica (patogênicas), comparando os tempos D:30 e D:45 com o tempo D:0 (fabricação do queijo). No tempo D:45 há a redução expressiva da espécie *Staphylococcus aureus* e o reaparecimento das espécies *Serratia liquefaciens* e da *Serratia proteamaculans*, identificadas no tempo D:0 e após não tiveram uma abundância significativa.

Abaixo, pode-se verificar os gêneros das bactérias patogênicas identificadas nas amostras de QAS, com algumas de suas características mais importantes, bem como, onde eles já foram identificados anteriormente em alimentos e em outros ambientes diversos. Pode-se verificar a Tabela com a classificação biológica das bactérias patogênicas nas amostras de QAS em diferentes temperaturas no anexo E.

4.11 ANÁLISE METAGENÔMICA (NGS) (FUNGOS)

A taxonomia do reino Fungi possuiu um total de 338.305 *reads*, sendo que a maior abundância fúngica ocorreu no tempo D:30 na temperatura de 12,5 °C e comparando a abundância ao longo da maturação do QAS, a menor abundância ocorreu com o QAS maturado, na temperatura em 5 °C no tempo (D:15).

No anexo F, pode-se observar a taxonomia geral dos fungos identificados no experimento com as suas respectivas abundâncias (*reads*) (reino-gênero), em diferentes temperaturas (5; 12,5 e 20 °C) ao longo de sua maturação.

Foram encontrados três filos nas amostras analisadas, o filo *Ascomycota* (taxonomia total 287.454 *reads*); o filo *Basidiomycota* (taxonomia total 42.558 *reads*) e o filo *Mucoromycota* (taxonomia total 8.291). Pode-se analisar que o filo *Mucoromycota* não esteve presente no dia da fabricação do QAS, estando somente presente em duas análises, no tempo D:15 (5 °C e 12,5 °C) com uma taxonomia de (4.462 e 3.829 *reads*, respectivamente). O filo *Ascomycota* esteve presente em todos os tempos e temperaturas analisados, sendo este com maior predominância entre as amostras; a sua maior abundância ocorreu no tempo D:30 na temperatura de 12,5 °C, apresentando 107.330 *reads*.

Os fungos foram divididos em sete classes. A classe *Saccharomycetes* apresentou uma taxonomia total de 255.821 *reads*; possuindo a sua maior abundância no tempo D:30, temperatura de 12,5 °C (97.891 *reads*), e a menor no tempo D:15 em 5 °C (1.605). A classe *Tremellomycetes* apresentou uma totalidade de 41.295 *reads*, ao longo da maturação do QAS, possuindo a sua maior abundância no tempo D:60 na temperatura de 12,5 °C (35.367 *reads*) e a menor no tempo D:60 a 20 °C (133 *reads*). A classe *Eurotiomycetes* possuiu uma abundância total de 15.860 *reads*, identificada em somente duas amostras; a amostra que possuiu a maior abundância foi a da amostra tempo D:30, 12,5 °C (9.439 *reads*) e a menor no tempo D:60 a 20 °C (6.421 *reads*). Quanto a *Dothideomycetes* foi identificada uma abundância total de 15.749 *reads* ao longo do experimento, identificada em somente duas amostras D:15 a 20 °C e a amostra D:60 a D:15 a 12,5 °C (15.032 e 717 *reads*, respectivamente).

A classe *Mucoromycetes* apresentou um total de 8.291 *reads*; também estando presente em somente duas amostras: (D:15 a 5 e em 12,5 °C) (4.462 e 3.829 *reads*, respectivamente). A classe *Agaricomycetes* obteve um total de 1.263 *reads* ao longo do experimento, sendo que a amostra que apresentou maior abundância foi a amostra D:30 a 20 °C e a menor foram nos dias D:0 e D:30 a 5 °C com uma abundância de 113 *reads*, respectivamente. E por fim, a classe *Sordariomycetes* foi identificada somente em uma amostra no experimento (24 *reads*).

Os fungos pertencem a oito ordens diversas com uma taxonomia total de 338.305 *reads*, sendo eles: *Saccharomycetales* (255.821 *reads*); *Trichosporonales* (40.631 *reads*); *Eurotiales* (15.860 *reads*); *cladosporiales* (15.749 *reads*); *Mucorales* (8.291 *reads*); *Agaricales* (1.263 *reads*); *Filobasidiales* (664 *reads*) e por fim, a ordem *hypocreales* (24 *reads*). A ordem de fungos *saccharomycetales* esteve presente em todos os tempos e temperaturas, exceto no tempo D:60 na temperatura de maturação de 20 °C, e ao contrário disto, a ordem *Hypocreales* somente esteve presente neste tempo e temperatura.

Quanto à classificação dos fungos por suas famílias, eles se diferenciam doze famílias ao longo do experimento (taxonomia total 338.305 *reads*), sendo elas: *Debaryomycetaceae*

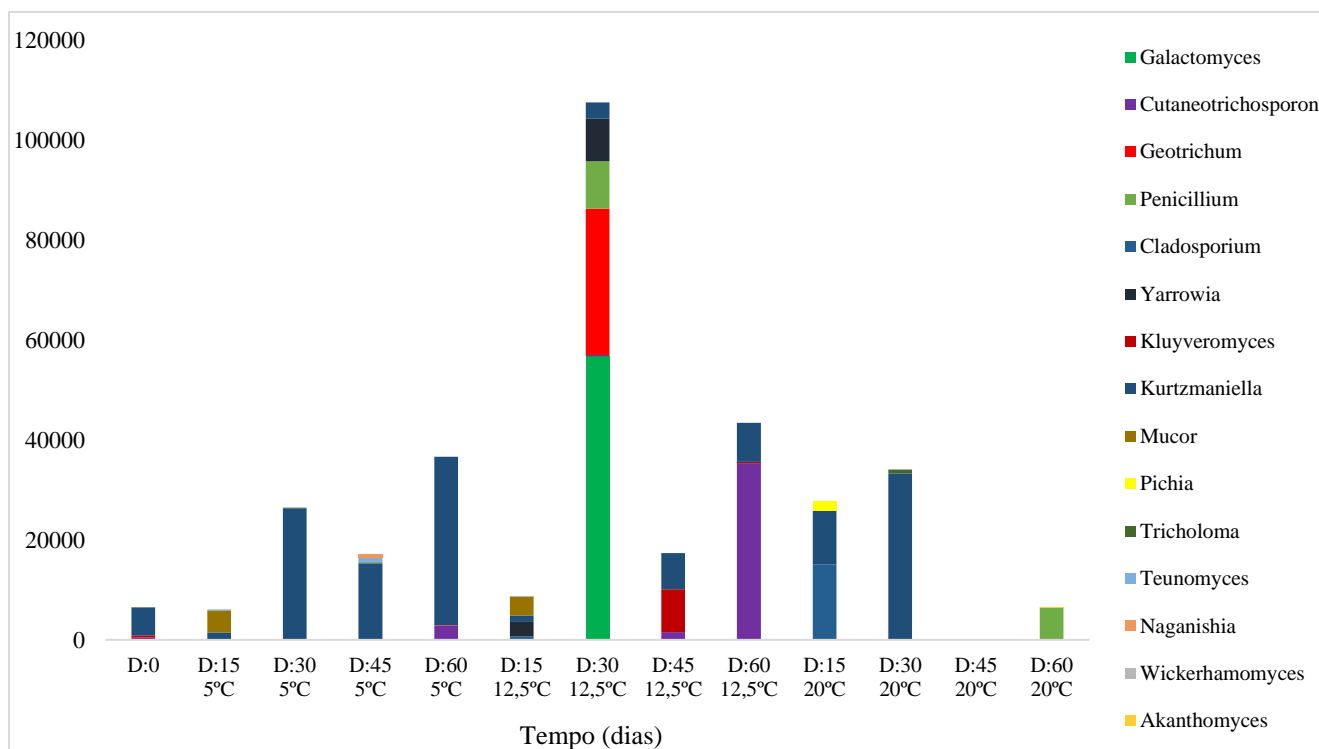
(taxonomia total de 147.026 *reads*), a maior abundância dessa família ocorreu na amostra D:60 a 5 °C (33.694 *reads*), e a menor no tempo D:15 em 12,5 °C (1.257 *reads*).

A família *Dipodascaceae* apresentou uma taxonomia total de 97.514 *reads*; tendo a sua maior abundância na amostra D:30 a 12,5 °C (94.599 *reads*), e a menor no tempo D:60 em 5 °C (17 *reads*). *Trichosporonaceae* (taxonomia total de 40.631 *reads*); apresentou a sua maior e menor abundância no tempo D:60, diferenciando-se pela temperatura de maturação 12,5 °C e em 20 °C (35.367 e 133 *reads*, respectivamente). Entretanto, as demais famílias apresentaram as seguintes abundâncias ao longo da maturação do QAS: *Aspergillaceae* (15.860 *reads*); *Cladosporiaceae* (15.749 *reads*); *Saccharomycetaceae* (9.235 *reads*); *Mucoraceae* (8.291 *reads*); *Pichiaceae* (1.967 *reads*); *Tricholomataceae* (1.263 *reads*); *Filobasidiaceae* (664 *reads*); *Phaffomycetaceae* (79 *reads*) e a família *Cordycipitaceae* (24 *reads*).

Houve a presença de quinze gêneros dos fungos presentes ao longo da maturação do QAS (taxonomia total 338.305 *reads*) (Gráfico 3): *Kurtzmaniella* (145.920 *reads*); *Galactomyces* (56.767 *reads*); *Cutaneotrichosporon* (40.631 *reads*); *Geotrichum* (29.326 *reads*); *Penicillium* (15.860 *reads*); *Cladosporium* (15.749 *reads*); *Yarrowia* (11.421 *reads*); *Kluyveromyces* (9.235 *reads*); *Mucor* (8.291 *reads*); *Pichia* (1.967 *reads*); *Tricholoma* (1.263 *reads*); *Teunomyces* (1.106 *reads*); *Naganishia* (664 *reads*); *Wickerhamomyces* (79 *reads*) e o gênero *Akanthomyces* (24 *reads*).

O gênero que esteve mais presente nas amostras de QAS ao longo de sua maturação foi o *Kurtzmaniella*, sendo que ele não esteve presente somente no tempo D:30 na temperatura de 20 °C; e os gêneros fúngicos com a menor presença nas amostras foram os gêneros *Naganishia*, *Wickerhamomyces* e o *Akanthomyces*, apresentando-se em somente uma amostra cada.

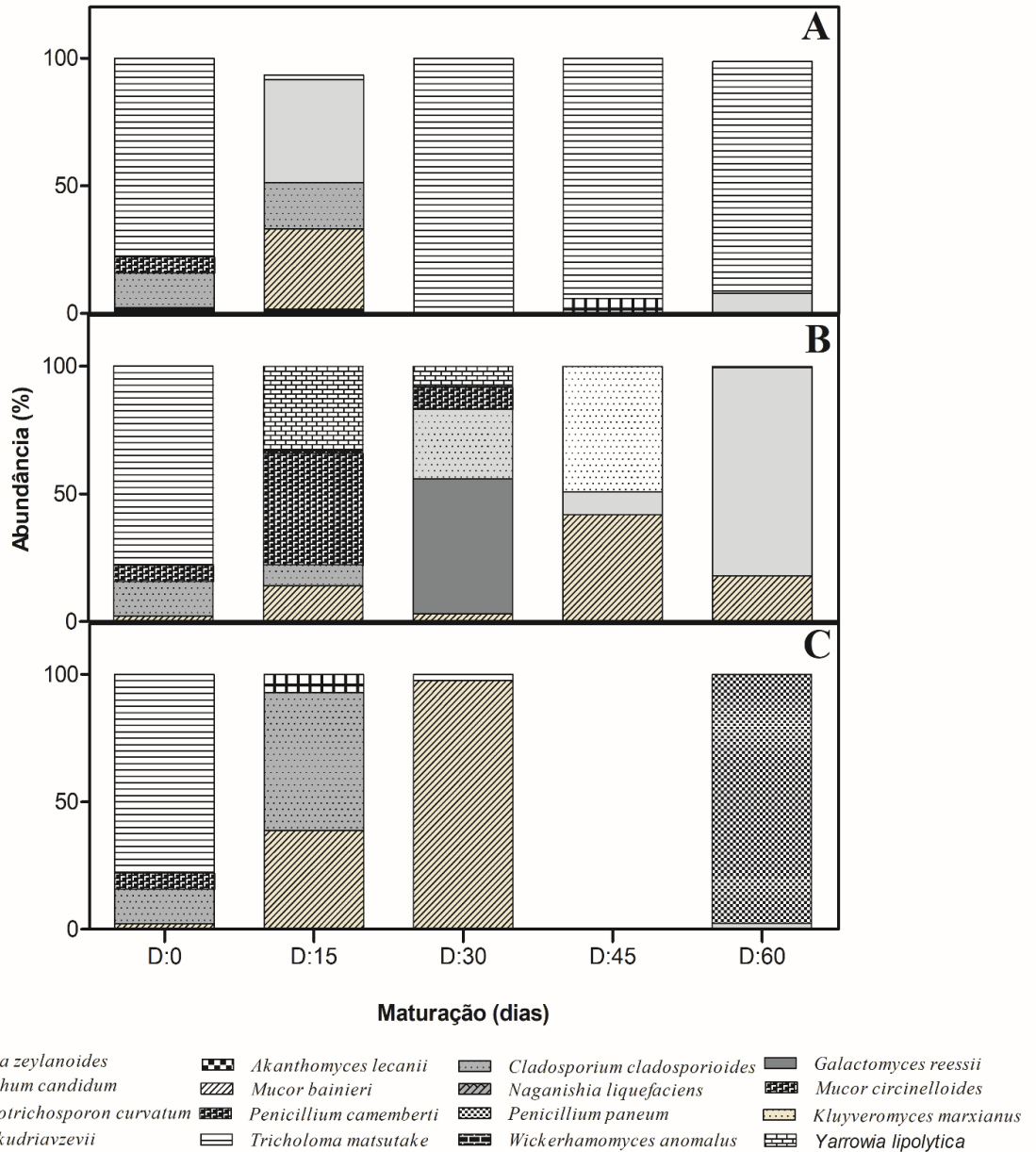
Gráfico 3: Taxonomia dos gêneros fúngicos (*reads*) identificados durante a maturação do QAS (exibição pela sua quantidade).



Fonte: Própria (2022).

Foram identificadas dezessete espécies de fungos nas amostras de QAS, durante ao longo de sua maturação, estando presentes as seguintes espécies: *Candida zeylanoides* (145.920 reads); *Galactomyces reessii* (56.767 reads); *Cutaneotrichosporon curvatum* (40.631 reads); *Geotrichum candidum* (29.326 reads); *Cladosporium cladosporioides* (15.749 reads); *Yarrowia lipolytica* (11.421 reads); *Kluyveromyces marxianus* (9.235 reads); *Penicillium camemberti* (9.023 reads); *Mucor circinelloides* (7.071 reads); *Penicillium paneum* (6.837 reads); *Pichia kudriavzevii* (1.967 reads); *Tricholoma matsutake* (1.263 reads); *Mucor bainieri* (1.220 reads); *Candida sake* (1.106 reads); *Naganishia liquefaciens* (664 reads); *Wickerhamomyces anomalus* (79 reads) e a espécie *Akanthomyces lecanii* (24 reads).

Figura 29: Taxonomia das espécies de fungos identificados durante a maturação do QAS (exibição pela sua diversidade).



Fonte: (Própria, 2022).

Pode-se verificar que a maior espécie fúngica encontrada nas amostras de QAS, ao longo de sua maturação foi *Pichia kudriavzevii*, estando presente em todos os tempos de maturação,

entretanto, essa espécie é mais evidente na temperatura de maturação de 5 °C. A maior diversidade fúngica ocorreu nas amostras de QAS maturados em 12,5 °C, possuindo mais espécies em evidência. Comparando as amostras de queijo maturados no tempo D:30, pode-se analisar que a maior diversidade fúngica ocorreu na temperatura de 12,5 °C.

Na temperatura de maturação de 20 °C, observam-se algumas peculiaridades na identificação das espécies fúngicas, como no tempo D:0 uma maior diversidade da espécie *Tricholoma matsutake* e após a sua abundância é insignificante graficamente. A espécie *Cladosporium cladosporioides* apresenta um aumento em sua abundância no tempo D:15 em comparação ao tempo D:0, e, por fim, no tempo D:60, a maior abundância fúngica é da espécie *Penicillium paneum*, não identificando as demais espécies presentes no gráfico. No anexo G, pode-se verificar a classificação biológica fúngica nas amostras de QAS em diferentes temperaturas (5; 12,5 e 20 °C), ao longo de sua maturação.

4.12 ANÁLISE METAGENÔMICA E PROTEÔMICA DO LEITE CRU

A microbiota, predominante no leite cru, geralmente inclui espécies de *BAL* (*Lactococcus*, *Lactobacillus* spp., *Leuconostoc*, *Enterococcus* ou *Streptococcus* spp.), *Pseudomonas* spp., bactérias pertencentes à família *micrococcaceae* (*micrococcus* e *Staphylococcus* spp.) e leveduras. Outros grupos microbianos presentes no leite cru também incluem *Bacillus*, *clostridium*, *Listeria* spp. e enterobactérias. Há também muitas espécies como *acinetobacter*, *alcaligenes*, *flavobacterium* e *aeromonas*, *arthrobacter*, *corynebacteriu*, *brevibacterium* e *propionibacterium* (LAFARGE *et al.*, 2004).

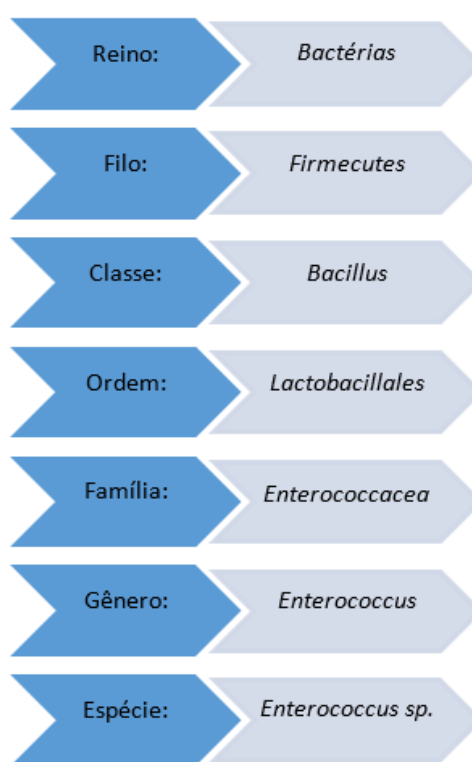
Muitas espécies causadoras de mastite também são encontradas no leite. A mastite bovina é uma resposta inflamatória do tecido do úbere na glândula mamária, causada por trauma físico ou infecções por micro-organismos e leva a perdas econômicas aos laticínios devido à diminuição do rendimento dos produtos e pela má qualidade do leite (GOMES *et al.*, 2016). A mastite pode ser classificada em três classes, dependendo do grau de inflamação (mastite clínica, subclínica e crônica). A mastite clínica é detectada facilmente por apresentar anormalidades visíveis no úbere (coloração vermelha, inchaço e febre nas vacas-leiteiras), sendo que o leite também se apresenta com a presença de grumos e coágulos (KHAN *et al.*, 2006).

A mastite subclínica não apresenta anormalidades visíveis no úbere ou no leite, entretanto, a produção do leite diminui e aumenta a CCS do leite (ABEBE *et al.*, 2016). Entretanto, a mastite crônica consiste em um processo inflamatório que persiste por vários meses, com surtos clínicos ocorrendo em intervalos irregulares. A mastite também pode possuir duas origens, a do tipo bacteriana (contagiosa) e a mastite ambiental (LAKEW *et al.*, 2019). A mastite contagiosa refere-se à mastite que pode ser transmitida de vaca para vaca, especialmente, durante a ordenha (SCHREINER *et al.*, 2002). No entanto, os patógenos ambientais geralmente não vivem na pele do úbere e do teto dos animais; eles existem na cama e no alojamento do rebanho sendo denominados de patógenos oportunistas, procurando a chance de causar uma infecção (CHENG *et al.*, 2020). Conforme Idriss *et al.*, (2013), a análise de CCS do leite pode ser usada como um indicador da saúde do úbere de vacas lactantes, sendo que vacas saudáveis ou que já se recuperaram de mastite devem possuir um valor de CCS abaixo de 200.000 CS/mL, e vacas com contagens acima de 400.000 CS/mL devem ser consideradas com infecção intramamária.

4.12.1 Análise metagenômica (NGS) (Bactérias) do leite

Na análise do leite cru, pela técnica rDNA 16S, foi identificada a seguinte árvore filogenética das bactérias presentes no leite (Figura 30): o reino foi o das bactérias, do filo *firmecutes*, classe dos *bacilos*, ordem *lactobacillales*, família *enterococaceae*, gênero *Enterococcus* e a espécie encontrada foi do gênero *Enterococcus* sp. (totalizando 10.781 reads em cada classificação apresentada).

Figura 30: Classificação taxonômica do leite cru, através da técnica rDNA 16S.



Fonte: Própria (2022).

Os *Enterococcus* são um grupo muito diversificado de micro-organismos que possui algumas espécies de BAL isoladas de vários ambientes, incluindo o sistema digestivo de humanos, animais e insetos, como de biomas naturais, como a água (SADOWY *et al.*, 2014; MARTIN *et al.*, 1972), esgoto (NOWAKIEWICZ *et al.*, 2017), solo (MICALLEF *et al.*, 2013) entre outros. Esse gênero, foi também isolado em plantas, como azeitonas (FRANZ *et al.*, 1996), como também é encontrado em plantas na natureza (MUNDT *et al.*, 1963; MÜLLER *et al.*, 2001).

Algumas espécies também são comensais, que podem estimular o sistema imunológico e ter uma influência significativa na manutenção da homeostase intestinal (SAILLANT *et al.*, 2021; LAISSUE *et al.*, 1993). Elas também podem ser probióticos e podem desenvolver um papel importante na ciência dos alimentos, como cultura iniciadora envolvida na fermentação de carnes e queijos (11) e na preservação de alimentos (GELSOMINO *et al.*, 2001; FRANZ *et al.*, 2011; GIRAFFA, 2002; GIRRAFA, 2003).

No entanto, algumas espécies de *enterococos* podem atuar como patógenos (O'DRISCOLL *et al.*, 2015) e contaminar alimentos (GELSOMINO *et al.*, 2001), devido à sua virulência e multirresistência algumas vezes presentes, e representam uma ameaça ao ambiente hospitalar (GUZMAN *et al.*, 2016). Algumas pesquisas sugerem que esses micro-organismos possuem um papel no desenvolvimento de algumas doenças, como a tumorigênese do cólon (CHENG *et al.*, 2020). Entretanto, alguns autores consideram a sua presença nos alimentos, como sendo positiva, e outros, como negativa, porém esta abordagem difere-se em cada nação.

4.12.2 Análise proteômica do leite cru (MALDI-TOF-MS)

Na análise realizada pela técnica MALDI-TOF-MS, foram identificadas três espécies de micro-organismos presentes no leite cru, sendo eles *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus saprophyticus*, *Stenotrophomonas maltophilia*.

O leite cru analisado quanto à sua CCS, este em conformidade à legislação brasileira (BRASIL, 2018). Entretanto, ainda assim, é possível identificar alguns micro-organismos patógenos no leite, que podem se multiplicar, aumentando este resultado de CCS futuramente, portanto, conhecê-los presentes no leite através de desta técnica, faz-se necessário para o tratamento dos animais para a eliminação desses micro-organismos presentes, ambientalmente, no leite ou nos animais.

4.12.2.1 *Enterococcus faecalis*

A espécie *Enterococcus faecalis* é um contaminante ambiental do leite e está associada à presença de mastite nos animais. *Enterococcus faecalis* é o *Enterococcus* spp. predominante, seguido por *Enterococcus faecium*. São patógenos gram-negativos ambientais presentes no material orgânico de cama do rebanho dos animais. Patogênese

do *Enterococcus faecalis* foi relatada relacionado à formação de biofilme (ELHADIDY *et al.*, 2014).

Além disso, tanto o *Enterococcus faecalis* e *Enterococcus faecium* foram relatados como resistentes aos vários antibióticos, como: lincomicina, tetraciclina, canamicina, estreptomicina, quinupristina/dalfopristina, eritromicina, cloranfenicol e tilosina devido à presença de biofilme. Isso leva a ocorrências frequentes de infecções por enterococos, recorrentes e persistentes, difíceis de tratar (ELHADIDY *et al.*, 2014).

4.12.2.2 *Stenotrophomonas maltophilia*

Stenotrophomonas maltophilia é um bacilo gram-negativo, não esporulado, aeróbio obrigatório, não fermentador de glicose, é reto ou ligeiramente curvo, que mede entre 0,5 a 1,5 µm de comprimento, podendo ser móvel devido a vários flagelos polares. As colônias são lisas, de cor branca ou amarela pálida brilhante com bordas bem definidas, o seu crescimento é ótimo a 35 °C e não acontece em temperaturas menores de 5 °C ou maiores de 40 °C (DENTON *et al.*, 1998).

O habitat da *Stenotrophomonas maltophilia* é bastante diverso, ela é encontrada em uma grande variedade de ambientes e regiões geográficas. Já foi isolada em diversas fontes de água, incluindo rios (NAKATSU *et al.*, 1955), garrafas de água (HERNANDEZ-DUQUINO *et al.*, 1987) e esgotos (AZNAR *et al.*, 1992). Também foi recuperada de diversos tipos de solos (BOLLET *et al.*, 1995) e plantas como capim, cana-de-açúcar, palmeiras (JUNKE *et al.*, 1989), e em leite (JUFFS HS, 1973).

No experimento de Zhang *et al.*, (2014), analisando a microbiota do leite cru de vacas leiteiras na China, identificaram a presença da espécie *Stenotrophomonas maltophilia* no leite analisado. Ohnishi *et al.*, (2012) verificaram que isolados de *Stenotrophomonas maltophilia* estavam relacionados em um surto de mastite em bovinos leiteiros no Japão.

A contaminação dessa espécie, por suas fezes, pode ser o principal meio de contaminação do leite, pois os tetos em contato com a cama dos animais e as suas fezes, desempenham um papel importante em sua multiplicação bacteriana, pois elas podem ser transferidas dessas superfícies entrando no teto (ZEHNER *et al.*, 1986; HOGAN *et al.*, 1999; ZDANOWICZ *et al.*, 2004).

Brooke *et al.*, (2012) citam que essa espécie foi encontrada como um patógeno bacteriano gram-negativo ambiental que pode causar várias infecções graves em humanos.

Segundo Alonso *et al.*, (1997), as infecções causadas pela *Stenotrophomonas maltophilia* são difíceis de serem tratadas, devido a sua multirresistência à ação de antibióticos.

4.12.2.3 *Staphylococcus saprophyticus*

A espécie *Staphylococcus saprophyticus* é uma bactéria esférica, gram-positiva, anaeróbia, facultativa, imóvel, não esporulado, não encapsulada e de 0,5 a 1 µm de diâmetro. Possui atividade ureásica e carece de coagulase, o que permite diferenciá-la do *Staphylococcus aureus* (HIRZEL, 2004). Ela está presente na microbiota normal da pele em humanos, na região periuretral e mucosas das vias urinárias e genitais e quando ocorre desequilíbrio da microbiota dessas vias, causa infecção urinária (LEVINSON, 2010).

As espécies predominantes de *Staphylococcus* coagulase negativa (SCN), como *Staphylococcus saprophyticus*, geralmente, estão presentes na cama dos animais e no ambiente onde as vacas se vivem (MATOS *et al.*, 1991), como também já foram isolados em seu pelo, nas narinas, na pele de tetos (DEVRIESE *et al.*, 1980; BODDIE *et al.*, 1987; WHITE *et al.*, 1989).

No leite, a espécie foi identificada pelos autores Srednik *et al.*, (2017), na Argentina, analisando quartos mamários de 18 vacas doentes com a presença de mastite clínica, sendo os isolados estafilocócicos foram testados por difusão em disco quanto à sua suscetibilidade antimicrobiana. A resistência à cefoxitina foi investigada por PCR e sequenciamento para os genes *mecA* e *mecC*. Os autores verificaram que a espécie *Staphylococcus saprophyticus* é resistente ao antibiótico cefoxitina, sendo *mecA*-negativo, e *mecC*-positivo. No experimento de Persson *et al.*, (2011), na Suécia, eles verificaram que a espécie *Staphylococcus saprophyticus* ocorre predominantemente em vacas lactantes com a presença de mastite subclínica.

Finalmente, depois dessa longa discussão, Lange *et al.*, (2015) encontraram a presença da espécie *Staphylococcus saprophyticus* em isolados de mastite no Brasil, através da técnica rDNA 16S. Delbès *et al.*, (2005), também encontraram esta espécie no leite do seu experimento.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A inspeção visual e documental da agroindústria mostrou que ela possui Boas Práticas de Fabricação para a produção do QAS, estando conforme em todos os itens avaliados *in loco*, como também possui conformidade aos dezesseis itens no atendimento às Boas Práticas Agropecuárias da propriedade.

As análises físico-químicas e microbiológicas do leite cru demonstraram que somente o parâmetro de lactose anidra esteve não conforme à legislação brasileira. Na análise proteômica do leite cru, foram identificadas três espécies patogênicas causadoras de mastite no leite: *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus saprophyticus*, *Stenotrophomonas maltophilia*, entretanto, na análise metagenômica nenhuma destas espécies foram identificadas, somente identificado o gênero *Enterococcus* sp.

Quanto aos padrões físico-químicos do queijo, os resultados demonstraram que houve diversas inconformidades com a legislação, em diferentes tempos/temperaturas de maturação, como na análise de umidade, gordura e GES (gordura no extrato seco). Para os demais padrões, não há legislação específica, e eles corroboram-se entre si. Na análise da umidade do queijo, somente o queijo maturado na temperatura de 5 °C, apresentou-se conforme a legislação (BRASIL, 1996) após 45 dias de maturação, tal resultado pode ser interferência do peso do queijo escolhido do experimento (500g). Quanto a sua gordura, houve o acréscimo em todos os tempos/temperaturas, porém houve somente conformidade no tempo de 15 dias de maturação (nas temperaturas de armazenamento em 12,5 e em 20 °C). Relacionando a este parâmetro, pode-se analisar que o parâmetro de GES possuiu conformidade em todos os tempos de armazenamento na temperatura de 5 °C, e, após 45 dias de maturação, nas demais temperaturas do estudo.

Quanto aos parâmetros físico-químicos analisados do queijo sem especificação técnica, a acidez, o teor de NaCl e o seu pH foram ampliando ao longo do experimento, contrapondo esses valores, a análise de Aw do QAS, foi diminuindo.

Os resultados microbiológicos dos queijos foram avaliados estatisticamente e demonstram que houve crescimento de alguns micro-organismos nas amostras analisadas, tais como coliformes termotolerantes, coliformes totais e *Staphylococcus* Coagulase Positiva. Entretanto, analisando nos diferentes tempos/temperaturas de maturação, estes são inativados ou diminuem ao longo do experimento. Para os demais micro-organismos analisados, não houve a detecção de sua presença.

Nas condições ambientais estudadas, as temperaturas mais altas de maturação (12,5 e 20 °C) após 30 dias de maturação, mostraram ser as mais adequadas, dado que as bactérias de origem alimentar atingiram uma população segura, atendendo à legislação brasileira. A maturação do QAS em temperaturas mais baixas (5 °C) mostrou-se inadequada, visto que os micro-organismos, como *Staphylococcus coagulase positiva*, não foram inativados durante todo o período de maturação (60 dias), indicando a necessidade de a atual regulamentação brasileira para os queijos de leite cru ser revisada. Desta forma, pode-se concluir que um controle de temperatura de maturação do QAS é de grande importância para ele atingir os padrões estabelecidos em seu RTIQ, sendo que os resultados estatísticos demonstram que a inativação dos micro-organismos analisados depende de diversos fatores físico-químicos combinantes, como a A_w , acidez titulável e o teor de NaCl.

Quanto à análise metagenômica do QAS, ao longo de sua maturação, quinze espécies de BALs foram identificadas no experimento, entretanto, as espécies que possuíam maior abundância foram *Enterococcus* sp. (163.757 reads), *Lactococcus* sp. (120.953 reads) e o *Lactobacillus casei* (649 reads). Também foram identificadas quarenta e cinco espécies de bactérias patogênicas nos queijos, sendo que as espécies que tiveram as maiores abundâncias foram *Serratia liquefaciens* e a *Serratia marcescens* (8.221 e 6.836 reads, respectivamente). Foram identificadas, também, dezessete espécies fúngicas nas amostras de QAS, sendo que as espécies mais abundantes foram *Candida zeylanoides*, *Galactomyces reessii* e *Cutaneotrichosporon curvatum* (145.920; 56767 e 40631 reads, respectivamente).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABEBE, R; HATIYA, H; ABERA, M; *et al.* **Bovine mastitis: prevalence, risk factors and isolation of *Staphylococcus aureus* in dairy herds at Hawassa milk shed, South Ethiopia.** BMC Veterinary Research, v. 12, n. 1, p. 270, 2016. Disponível em: <<https://doi.org/10.1186/s12917-016-0905-3>>. Acesso em: 28 jan. 2022.

ADOLFO LUTZ. **Normas analíticas do Instituto Adolfo Lutz: Métodos físicos e químicos para análises de alimentos**, (2008).

AGUIAR, G. S. *et al.* **Avaliação da presença de antibiótico em leite cru refrigerado.** Revista UNIVAP, São José dos Campos-SPBrasil, ISSN 2237-1753. v. 22, n. 40, Edição Especial 2016. Disponível em: <https://revista.univap.br/index.php/revistaunivap/article/view/952>. Acesso em: 25 jul. 2021.

AKIYAMA, H. *et al.*, **Antibacterial action of several tannins against *Staphylococcus aureus*.** Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 48(4), 487–491.2001. doi:10.1093/jac/48.4.487. Disponível em: <<https://academic.oup.com/jac/article/48/4/487/700315>>.

AKIYAMA; S; TAKII, K; MOKA, T; *ET AL.*, **Palatability and availability of red sea bream to yeast proteins.** Fishery growth, v. 49, n. 1, p. 47–52, 2001. Disponível em: <https://www.jstage.jst.go.jp/article/aquaculturesci1953/49/1/49_1_47/_article/-char/ja/>.

ALBERTS, B. *et al.* **Biologia molecular da célula.** 6 ed. Porto Alegre: Artmed, 2017. 1467p.

ALDRETE-TAPIA, A; ESCOBAR-RAMÍREZ, MC; TAMPLIN, ML.; *et al.* **High-throughput sequencing of microbial communities in Poro cheese, an artisanal Mexican cheese.** Food Microbiology, v. 44, p. 136–141, 2014.

ALMEIDA, EC. **Caracterização bioquímica e genética de bactérias lácticas isoladas de queijo serrano.** 2014. Disponível em: <<https://repositorio.ucs.br/xmlui/handle/11338/357>>. Acesso em: 27 jan. 2022.

ALMEIDA, FM; BELO, MAD. **Qualidade de leite bovino produzido em propriedades de agricultura familiar, Cacoal/RO,** p. 1–416, 2020. Disponível em: <<https://www.atenaeditora.com.br/post-artigo>>. Acesso em: 27 jan. 2022.

ALONSO, A; MARTÍNEZ, JL. **Multiple antibiotic resistance in *Stenotrophomonas maltophilia*.** Antimicrobial Agents and Chemotherapy, v. 41, n. 5, p. 1140–1142, 1997. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC163865/>>. Acesso em: 28 jan. 2022.

ALTSCHUL, SF.; GISH, W.; MILLER, W; *et al.* **Basic local alignment search tool.** Journal of Molecular Biology, v. 215, n. 3, p. 403–410, 1990.

AMBROSINI, LB. **Sistema agroalimentar do queijo serrano: estratégia de reprodução social dos pecuaristas familiares dos Campos de Cima da Serra-RS.** 2007. Disponível em: <<https://lume.ufrgs.br/handle/10183/13134>>. Acesso em: 27 jan. 2022.

ANDREWS, S. **FastQC**: a quality control tool for high throughput sequence data. 2010. AOAC international, **Official Methods of Analysis of AOAC (OMA)**. 2019. Online. Disponível em: <http://www.eoma.aoc.org>. Acesso em: 27 jan. 2022.

APHA, SALFINGER, Y. & TORTORELLO, ML. (eds.). **Compendium of Methods for Microbiological 361 Examination of Foods, 5^o ed. Washington**: American Public Health Association 362 (APHA), 2015.

ARAUJO, GB; SANTOS, HA; FARIAS, CE; *et al.* **Detecção de resíduo de antibiótico em leite in natura em laticínio sob inspeção federal**. Scientia Plena, v. 11, n. 4, 2015. Disponível em: <https://www.scientiaplenu.org.br/sp/article/view/2493>. Acesso em: 27 jan. 2022.

ARAÚJO, L.F. *et al.* **Avaliação da qualidade microbiológica de queijos cabacinha produzidos artesanalmente na região do Vale do Jequitinhonha (MG)**. In: XXV Congresso brasileiro de ciência e tecnologia de alimentos, 25, 2016, Minas Gerais. Alimentação: a árvore que sustenta a vida. Gramado/RS: Office Marketing, 2016. p. 1-6. Disponível em: <http://www.ufrgs.br/sbctars-eventos/xxvcbcta/anais/files/903.pdf>. Acesso em: 24 abr. 2021.

ARAÚJO, RABM. **Diagnóstico socioeconômico, cultural e avaliação dos parâmetros físico-químicos e microbiológicos do queijo Minas artesanal da região de Araxá**. 2004. Disponível em: <https://locus.ufv.br/handle/123456789/9041>. Acesso em: 27 jan. 2022.

ARBELLO, DDR; BRACCINI, VP; JIMÉNEZ, ME; *et al.* **Análise microbiológica e físico-química do leite produzido na cidade de Santana do Livramento – Rio Grande do Sul**. Research, Society and Development, v. 10, n. 6, p. e24310615561–e24310615561, 2021. Disponível em: <https://rsdjournal.org/index.php/rsd/article/view/15561>. Acesso em: 27 jan. 2022.

ARENAS, R; GONZÁLEZ, L; SACRISTÁN, N; *et al.* **Compositional and biochemical changes in Genestoso cheese, a Spanish raw cow's milk variety, during ripening**. Journal of the Science of Food and Agriculture, v. 95, n. 4, p. 851–859, 2015.

ARFI, K; LECLERQ-PERLAT, MN; BAUCHER, A; *et al.*, **Contribution of several cheese-ripening microbial associations to aroma compound production**. Le Lait, v. 84, n.5, p. 435-447, 2004.

ARIZCUN, C; BARCINA, Y; TORRE, P. **Identification and characterization of proteolytic activity of *Enterococcus* spp. isolated from milk and Roncal and Idiazábal cheese**. International Journal of Food Microbiology, v. 38, n. 1, p. 17–24, 1997.

AUDISIO, MC; GUILLERMO, O; APELLA, MC. **Protective Effect of *Enterococcus faecium* J96, a Potential Probiotic Strain, on Chicks Infected with *Salmonella Pullorum***. **Journal of Food Protection**, v. 63, n. 10, p. 1333–1337, 2000. Disponível em: <https://doi.org/10.4315/0362-028X-63.10.1333>. Acesso em: 3 fev. 2022.

AZNAR, R; ALCAIDE, E; GARAY, E. **Numerical Taxonomy of Pseudomonads Isolated from Water, Sediment and Eels**. 1992.

BACHMANN, H. -P; FRÖHLICH-WYDER, M. -T; JAKOB, E; *et al.* **Cheese | Raw Milk Cheeses.** In: FUQUAY, John W. (Org.). Encyclopedia of Dairy Sciences (Second Edition). San Diego: Academic Press, 2011, p. 652–660. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780123744074005197>>. Acesso em: 27 jan. 2022.

BAGGIO, AP; MONTANHINI, MTM. **Qualidade de leite cru produzido na região do Norte Pioneiro do Paraná.** Revista Brasileira de Higiene e Sanidade Animal, v. 11, n. 2, p. 184–189, 2017. Disponível em: <<http://www.higieneanimal.ufc.br/seer/index.php/higieneanimal/article/view/393>>. Acesso em: 27 jan. 2022.

BARANCELLI, GV; SILVA-CRUZ, JV; PORTO, E; *et al.* **Listeria monocytogenes: ocorrência em produtos lácteos e suas implicações em saúde pública.** Arquivos do Instituto Biológico, v. 78, p. 155–168, 2020. Disponível em: <<http://www.scielo.br/j/aib/a/bnRYSSXNWzxQ7fvWdvz3qqn/?lang=pt>>. Acesso em: 27 jan. 2022.

BARCELOS, MM; MARTINS, L; GRENFELL, RC.; *et al.* **Comparison of standard and on-plate extraction protocols for identification of mastitis-causing bacteria by MALDI-TOF MS.** Brazilian Journal of Microbiology, v. 50, n. 3, p. 849–857, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s42770-019-00110-5>>. Acesso em: 2 fev. 2022.

BAREA, JA; PARDINI, MIMC; GUSHIKEN, T. **Extração de DNA de materiais de arquivo e fontes escassas para utilização em reação de polimerização em cadeia (PCR).** Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia, v. 26, p. 274–281, 2004. Disponível em: <<http://www.scielo.br/j/rbhh/a/Sn5xDRhYBKxggG3NYXtCHdd/abstract/?lang=pt>>. Acesso em: 27 jan. 2022.

BASANISI, MG; NOBILI, G; LA BELLA, G; *et al.* **Molecular characterization of Staphylococcus aureus isolated from sheep and goat cheeses in southern Italy.** Small Ruminant Research, v. 135, p. 17–19, 2016. (Special Issue: Advances in Sheep and Goats Research: A Holistic Approach. Selected papers from SIPAOC 2014 Meeting, Italy). Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0921448815003648>>. Acesso em: 27 jan. 2022.

BASSI, D; GAZZOLA, S; SATTIN, E; *et al.* **Lactic Acid Bacteria Adjunct Cultures Exert a Mitigation Effect against Spoilage Microbiota in Fresh Cheese.** Microorganisms, v. 8, n. 8, p. 1199, 2020. Disponível em: <<https://www.mdpi.com/2076-2607/8/8/1199>>. Acesso em: 3 fev. 2022.

BASTOS, LR; PRATA, TAO; ABDALLAH, FR; *et al.* **Conformity of refrigerated raw milk from family production units of southern Espírito Santo.** Ciência Animal Brasileira, v. 19, 2018. Disponível em: <<http://www.scielo.br/j/cab/a/p76sFj4QDKWTszV8bp7bh5z/?lang=en>>. Acesso em: 27 jan. 2022.

BECKER, H; BÜRK, C; MÄRTLBAUER, E. **Staphylokokken-Enterotoxine: Bildung, Eigenschaften und Nachweis.** Journal für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit, v. 2,

n. 2, p. 171–189, 2007. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s00003-007-0190-y>>. Acesso em: 27 jan. 2022.

BELLIO, A; ASTEGIANO, S; TRAVERSA, A; *et al.* **Behaviour of *Listeria monocytogenes* and *Staphylococcus aureus* in sliced, vacuum-packaged raw milk cheese stored at two different temperatures and time periods.** International Dairy Journal, v. 57, p. 15–19, 2016. Disponível em: <<https://www.cabdirect.org/cabdirect/abstract/20163175990>>. Acesso em: 3 fev. 2022.

BELOTI, V; TAMANINI, R; NERO, LA; MOREIRAMAS; SILVA, LCC; FAGNANNI, R; REIS, KTMG. **Leite: Obtenção, Inspeção e Qualidade.**p.181-186, 2015.

BENINCÁ, T. **Queijo colonial artesanal no Vale do Taquari: numa perspectiva social, sanitária e microbiológica.** 2021. Disponível em: <<https://repositorio.uergs.edu.br/xmlui/handle/123456789/1354>>. Acesso em: 27 jan. 2022.

BIAGIOTTI, C; CIANI, M; CANONICO, L; *et al.* **Occurrence and involvement of yeast biota in ripening of Italian Fossa cheese.** European Food Research and Technology, v. 244, n. 11, p. 1921–1931, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s00217-018-3104-6>>. Acesso em: 28 jan. 2022.

BINTSIS, T. **Yeasts in different types of cheese.** AIMS microbiology, v. 7, n. 4, 2021. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35071942/>>. Acesso em: 31 jan. 2022.

BIOEASY®. **Bioeasy Milk Antibiotic Rapid test kits.** Disponível em: <<https://cap-lab.com.br/produtos/teste-rapido/compact-dry/>>. Acesso em: 10 de março de 2022.

BJÖRKROTH, K.J; VANDAMME, P. & KORKEALA, HJ. **Identification and characterization of *Leuconostoc carnosum*, associated with production and spoilage of vacuum-packaged, sliced, cooked ham.** Applied and Environmental Microbiology, v.64, p.3313–3319, 1998.

BODDIE, RL; NICKERSON, SC; OWENS, WE; *et al.* **Udder microflora in nonlactating heifers.** Agri Practice, 1987. Disponível em: <https://scholar.google.com/scholar_lookup?title=Udder+microflora+in+nonlactating+heifers.&author=Boddie+R.L.&publication_year=1987>. Acesso em: 28 jan. 2022.

BOLLET, C; DAVIN-REGLI, A; DE MICCO, PA. **Simple Method for Selective Isolation of *Stenotrophomonas maltophilia* from Environmental Samples.** Applied and Environmental Microbiology, v. 61, n. 4, p. 1653–1654, 1995. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1388425/>>. Acesso em: 28 jan. 2022.

BOU Trou, R.; GUÉGUEN, M. **Interests in *Geotrichum candidum* for cheese technology.** International Journal of Food Microbiology, v. 102, n. 1, p. 1–20, 2005. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0168160505000413>>. Acesso em: 31 jan. 2022.

BRASIL, **Leis, decretos, etc. Portaria n.º 371/97 do Ministério da Agricultura e do Abastecimento.** Aprova o regulamento técnico

para rotulagem de alimentos embalados. Disponível em: <<http://oc4j.agricultura.gov.br/agrolegis/do/consultaLei?op=viewTextual&codigo=3195>>. Acesso em: 3 fev. 2022.

BRASIL. **Instrução Normativa N.º 30 de 7 de agosto de 2013**. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília, DF, 07 de ago. de 2013, n.º 152, seção 1, p. 19.

BRASIL. Lei n.º 13.860, de 18 de julho de 2019. **Dispõe sobre a elaboração e a comercialização de queijos artesanais e dá outras providências**. Diário Oficial da União: seção 1, Brasília, DF, n. 138, p. 01, 19 jul. 2019.

BRASIL. Ministério da Agricultura e Abastecimento. Portaria n. 46, de 10 de fevereiro de 1998. **Institui o sistema de análise de perigos e pontos críticos de controle: APPCC** a ser implantado nas indústrias de produtos de origem animal. Diário Oficial da União, Brasília, DF, 10 fev. 1998. Seção I.

BRASIL. **Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento**. Guia orientativo para a elaboração do plano de qualificação de fornecedores de leite - PQFL. Brasília, DF: MAPA, 2019. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/assuntos/producao-animal/arquivos-publicacoes-bem-estar-animal/guia-orientativo-para-elaboracao-do-pqfl>>. Acesso em: 10 de março de 2021.

BRASIL. **Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento**. Instrução Normativa n.º 77 de 2 de novembro de 2018. Brasília, DF: MAPA. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, 2018.

BRASIL. **Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento**. Instrução Normativa n.º 76. Brasília, DF: MAPA. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, 2018.

BRASIL. **Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento**. Instrução Normativa n.º 68 de 12 de dezembro de 2006. Brasília, DF: MAPA, 2006. Disponível em: <<http://extranet.agricultura.gov.br/sislegisconsulta/consultarLegislacao.do?operacao=visualizar&id=17472>>. Acesso em: 10 de março de 2021.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Decreto n.º 9.013, de 29 de março de 2017**. Disponível em: <http://www2.camara.leg.br/legin/fed/decret/2017/decreto-9013-29-marco-2017_784536-publicacaooriginal-152253-pe.html>. Acesso em: 05 de fev. 2021.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Manual de Métodos Oficiais para Análise de Alimentos de Origem Animal**. 2019. Recuperado de: <https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/laboratorios/credenciamento-e-laboratorios-credenciados/legislacao-metodos-credenciados/arquivos-metodos-da-area-poiqa/ManualdeMtodosOficiaisparaAnlisedeAlimentosdeOrigemAnimal2ed.pdf>>. Acesso em: 05 de fev. 2021.

BRASIL. Ministério da Saúde. RDC n. 259 de 16 de ABRIL de 1999. **Regulamento Técnico sobre Rotulagem de Alimentos Embalados**. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília, DF, 2002. Disponível em: <https://lcqa.farmacia.ufg.br/up/912/o/resoluo_rdc_n_259_2002__rotulagem_em_geral.pdf>. Acesso em 22 mai. 2012.

BRASIL. Ministério da Saúde/Agência Nacional de Vigilância Sanitária/Diretoria Colegiada. **Instrução Normativa n.º 60, de 23 de dezembro de 2019.** Estabelece as listas de padrões microbiológicos para alimentos. Disponível em: <<https://www.in.gov.br/en/web/dou/-/instrucao-normativa-n-60-de-23-de-dezembro-de-2019-235332356>>. Acesso em: 05 de fev. 2021.

BRASIL. Ministério da Saúde/Agência Nacional de Vigilância Sanitária/Diretoria Colegiada. **RDC N.º 331, de 23 de dezembro de 2019.** Estabelece os padrões microbiológicos de alimentos e sua aplicação. Disponível em: <<https://www.in.gov.br/en/web/dou/-/resolucao-rdc-n-331-de-23-de-dezembro-de-2019-235332272>>. Acesso em: 05 de fev. 2021.

BRASIL. Portaria 146, de 11 de março de 1996. **Aprova os Regulamentos Técnicos de Identidade e Qualidade dos Produtos Lácteos.** Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília, DF, 11 de mar. de 1996, seção 1, p. 3977.

BRASIL. **Programas de Autocontroles.** 2019. Disponível em:<<https://www.agrodefesa.gov.br/defesa-sanitaria-animais/programas/160-defesa-sanit%C3%A1ria-animais/programas-de-autocontrole.html>>.

BRASIL. **Resolução RDC no 275 de 21 de outubro de 2002 da Secretária Nacional de Vigilância Sanitária do Ministério da Saúde.** 2002.

BRITO, MA; BRITO, JR; ARCURI, E; LANGE, C; SILVA, M; SOUZA, G. **Composição do leite.** 2009. Disponível em:<https://www.agencia.cnptia.embrapa.br/Agencia8/AG01/arvore/AG01_128_21720039243.html>.

BROOKE, JS. **Stenotrophomonas maltophilia: an emerging global opportunistic pathogen.** Clinical Microbiology Reviews, v. 25, n. 1, p. 2–41, 2012.

BRUNO, LM; CARVALHO, JDG. **Documentos 124: Microbiota láctica de queijos artesanais.** Fortaleza: Embrapa Agroindústria Tropical, 2009. 30 p.

BÜCHL, NR; SEILER, H. **Yeasts in milk and dairy products.** In: J. W. Fuquay JW, P. F. Fox P, & P. L. H. *Encyclopedia of Dairy Sciences*, 4 Eds., London: Elsevier Academic Press, 744–753.2011.

BUENO, VFF; MESQUITA, AJ; OLIVEIRA, AN; *et al.* **Contagem bacteriana total do leite: relação com a composição centesimal e período do ano no Estado de Goiás.** Revista Brasileira de Ciência Veterinária, v. 15, n. 1, 2008. Disponível em: <<https://periodicos.uff.br/rbcv/article/view/7055>>. Acesso em: 27 jan. 2022.

CABRAL, JF; SILVA, MAP; CARDOSO, TS; *et al.* **Relação da composição química do leite com o nível de produção, estágio de lactação e ordem de parição de vacas mestiças.** Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes, v. 71, n.4, 2016. Disponível em: <<https://www.revistadoilct.com.br/ilct/article/view/536>>. Acesso em: 27 jan. 2022.

CAMARGO, AC; COSTA, EA; FUSIEGER, A; *et al.* **Microbial shifts through the ripening of the “Entre Serras” Minas artisanal cheese monitored by high-throughput sequencing.** Food Research International (Ottawa, Ont.), v. 139, p. 109803, 2021.

CAMPOS, R; GONZÁLEZ, F; COLDEBELLA, A; *et al.* **Indicadores do ambiente ruminal e suas relações com a composição do leite e células somáticas em diferentes períodos da primeira fase da lactação em vacas de alta produção.** Ciência Rural, v. 36, p. 525–530, 2006. Disponível em: <<http://www.scielo.br/j/cr/a/CypLSBzJGpc5W88cN6ZVBDG/?lang=pt>>. Acesso em: 27 jan. 2022.

CAPORASO, JG; LAUBER, CL; WALTERS, WA; BERG-LYONS, D; HUNTLEY, J; FIERER, N; OWENS, SM; BETLEY, J; FRASER, L; BAUER, M; GORMLEY, N; GILBERT, JÁ; SMITH, G; KNIGHT, R: **Ultra-high-throughput microbial community analysis on the Illumina HiSeq and MiSeq platforms.** ISME J 2012, 6:1621–1624.

CARDOSO, VM; DIAS, RS; SOARES, BM; *et al.* **The influence of ripening period length and season on the microbiological parameters of a traditional Brazilian cheese.** Brazilian Journal of Microbiology, v. 44, p. 743–749, 2013. Disponível em: <<http://www.scielo.br/j/bjm/a/LpkWyvqxmJMzRkQphpftXMS/abstract/?lang=en>>. Acesso em: 27 jan. 2022.

CARMO, SL; DIAS, R. Souza; LINARDI, V. Roberto; *et al.* **Food poisoning due to enterotoxigenic strains of *Staphylococcus* present in Minas cheese and raw milk in Brazil.** Food Microbiology, v. 19, n. 1, p. 9–14, 2002. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0740002001904447>>. Acesso em: 2 fev. 2022.

CARPENTE, L; CERDEIRA-PENA, A; LORENZO-FREIRE, S; PLACES, AS. **Optimization in Sanger sequencing.** ELSEVIER Journal. Computers and Operations Research 109 (2019) 250–262.

CARR, FJ; CHILL, D; MAIDA, N. **The lactic acid bacteria: a literature survey.** Critical Reviews in Microbiology, v. 28, n. 4, p. 281–370, 2002.

CASALTA, E; MONTEL, MS. **Safety assessment of dairy microorganisms: the *Lactococcus* genus.** International Journal of Food Microbiology, v. 126, n. 3, p. 271–273, 2008.

CEOLIN, Lilian Varini. **Queijo artesanal serrano nos Campos de Cima da Serra (RS): análise da dimensão institucional de um sistema agroalimentar localizado.** Disponível em: <https://redib.org/Record/oai_articulo2762333-queijo-artesanal-serrano-nos-campos-de-cima-da-serra-rs-an%C3%A1lise-da-dimens%C3%A3o-institucional-de-um-sistema-agroalimentar-localizado>.

CHAJĘCKA-WIERZCHOWSKA, W; ZADERNOWSKA, A; GARCÍA-SOLACHE, M. **Ready-to-eat dairy products as a source of multidrug-resistant *Enterococcus* strains: Phenotypic and genotypic characteristics.** Journal of Dairy Science, v. 103, n.5, p. 4068–4077, 2020. Disponível em: <[https://www.journalofdairyscience.org/article/S0022-0302\(20\)30206-X/fulltext#relatedArticles](https://www.journalofdairyscience.org/article/S0022-0302(20)30206-X/fulltext#relatedArticles)>. Acesso em: 27 jan. 2022.

CHEN, K; NEIMARK, H; RUMORE, P; *et al.* **Broad range DNA probes for detecting and amplifying eubacterial nucleic acids.** FEMS Microbiology Letters, v. 57, n. 1, p. 19–24, 1989. Disponível em: <<https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.1989.tb03213.x>>. Acesso em: 27 jan. 2022.

CHENG, M-F; LIN, C-S; CHEN, Y-H; *et al.* **Inhibitory Growth of Oral Squamous Cell Carcinoma Cancer via Bacterial Prodigiosin.** Marine Drugs, v. 15, n. 7, p. 224, 2017. Disponível em: <<https://www.mdpi.com/1660-3397/15/7/224>>. Acesso em: 3 fev. 2022.

CHENG, WN; HAN, SG. **Bovine mastitis: risk factors, therapeutic strategies, and alternative treatments** - A review. Asian-Australasian Journal of Animal Sciences, v. 33, n. 11, p. 1699–1713, 2020.

CHENG, Y; LING, Z; LI, L. **The Intestinal Microbiota and Colorectal Cancer.** Frontiers in Immunology, v. 11, 2020. Disponível em: <<https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fimmu.2020.615056>>. Acesso em: 28 jan. 2022.

CLARRIDGE, JE. **Impact of 16S rRNA gene sequence analysis for identification of bacteria on clinical microbiology and infectious diseases.** Clinical Microbiology Reviews, v. 17, n. 4, p. 840–862, table of contents, 2004.

COCK, PETER JA; ANTAO, T; CHANG, JT.; *et al.* **Biopython: freely available Python tools for computational molecular biology and bioinformatics.** Bioinformatics (Oxford, England), v. 25, n. 11, p. 1422–1423, 2009.

COCOLIN, L; ALESSANDRIA, V; DOLCI, P; *et al.* **Culture independent methods to assess the diversity and dynamics of microbiota during food fermentation.** International Journal of Food Microbiology, v. 167, n. 1, p. 29–43, 2013.

CODEX ALIMENTARIUS COMMISSION. (1978). **Codex general standard for cheese.** CODEX STANDARD 283-1978. Food and Agriculture Organization of the United Nations/World Health Organization, Rome/Geneva. 1978. Disponível em <<http://www.codexalimentarius.org>>.

COELHO, MAZ; SALGADO, AM; RIBEIRO, BD. Indústria de Sucos. In: COELHO, MAZ; SALGADO, AM; RIBEIRO, B. D. **Tecnologia Enzimática.** Petrópolis: EPUB, 2008. Cap. 12, p. 288. ISBN 978-85-87098-83-2.

COLLINS, FS; MORGAN, M; PATRINOS, A. **The Human Genome Project: lessons from large-scale biology.** Science (New York, N.Y.), v. 300, n. 5617, p. 286–290, 2003.

CONTI, RM. **A influência da contagem de células somáticas do leite cru no rendimento da produção de queijo prato (lanche), junto ao Laticínio Sgorla situado na região do Vale do Taquari - RS.** 2017. Disponível em: <<https://www.univates.br/bdu/handle/10737/1425>>. Acesso em: 27 jan. 2022.

COSENTINO, S; FADDA, ME; DEPLANO, M; *et al.* **AntiListerial activity of nisin-like bacteriocin-producing *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* isolated from traditional Sardinian dairy products.** Journal of Biomedicine & Biotechnology, v. 2012, p. 376428, 2012.

COSTA, HN; MOLINA, LR; LAGE, CFA; *et al.* **Estimativa das perdas de produção leiteira em vacas mestiças Holandês x Zebu com mastite subclínica baseada em duas metodologias de análise.** Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia, v. 69, p. 579–586, 2017. Disponível em: <<http://www.scielo.br/j/abmvz/a/wytR9n5cW8DPxsCWxF83dYh/abstract/?lang=pt>>. Acesso em: 27 jan. 2022.

CRUZ, FT; MENASCHE, R. **O debate em torno de queijos feitos de leite cru: entre aspectos normativos e a valorização da produção tradicional.** Vigilância Sanitária em Debate, v. 2, n. 4, p. 34–42, 2014. Disponível em: <<https://visaemdebate.incqs.fiocruz.br/index.php/visaemdebate/article/view/408>>. Acesso em: 27 jan. 2022.

CRUZ, AC. **Avaliação dos fatores abióticos e bióticos de uma área petroquímica da região de paulínia, sp, e fotodocumentação dos fungos transientes isolados.** Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências do Campus de Rio Claro, Universidade Estadual Paulista. 2010.

CUNHA, RPL; MOLINA, LR; CARVALHO, AU; *et al.* **Mastite subclínica e relação da contagem de células somáticas com número de lactações, produção e composição química do leite em vacas da raça Holandesa.** Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia, v. 60, p. 19–24, 2008. Disponível em: <<http://www.scielo.br/j/abmvz/a/Mvc5fgvZtRXFJC4kJRdTm3Q/abstract/?lang=pt>>. Acesso em: 27 jan. 2022.

DALMINA, KA. **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. 2018.

DAVID, EA; PEREIRA, ACP; MENETRYER, I. **Análise dos índices de CCS e CBT do leite de cinco pequenos produtos de Fernandes Pinheiro – Paraná.** Revista Scientia Rural - ISSN 2178-3608, v. 1, n. 2, p. 94–108, 2021. Disponível em: <<http://www.cesage.com.br/revistas/index.php/ScientiaRural/article/view/1589>>. Acesso em: 27 jan. 2022.

DE DEA LINDNER, J; BERNINI, V; LORENTIIS, A; *et al.* **Parmigiano Reggiano cheese: Evolution of cultivable and total lactic microflora and peptidase activities during manufacture and ripening.** <http://dx.doi.org/10.1051/dst:2008019>, v. 88, 2008.

DE KRUIF, CG; HUPPERTZ, T; URBAN, VS; *et al.* **Casein micelles and their internal structure.** Advances in Colloid and Interface Science, v. 171–172, p. 36–52, 2012.

DE SOUZA MOTTA, AS; GOMES, MSM. **Propriedades tecnológicas e funcionais de bactérias ácido lácticas: a importância destes microrganismos para alimentos.** Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes, v. 70, n. 3, p. 172–184, 2015. Disponível em: <<https://www.revistadoilct.com.br/rilct/article/view/403>>. Acesso em: 27 jan. 2022.

DELAVERNE, E; MOUNIER, J; ASMANI, K; *et al.* **Fungal diversity in cow, goat and ewe milk.** International Journal of Food Microbiology, v. 151, n. 2, p. 247–251, 2011. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0168160511005174>>. Acesso em: 31 jan. 2022.

DELBÈS, C; MONTEL, MC. **Design and application of a *Staphylococcus*-specific single strand conformation polymorphism-PCR analysis to monitor *Staphylococcus* populations diversity and dynamics during production of raw milk cheese.** Letters in Applied Microbiology, v. 41, n.2, p. 169–174, 2005.

DELBÈS-PAUS, C; MISZCZYCHA, S; GANET, S; *et al.* **Behavior of *Escherichia coli* O26:H11 in the presence of *Hafnia alvei* in a model cheese ecosystem.** International Journal of Food Microbiology, v. 160, n.3, p. 212–218, 2013.

DENTON, M; KERR, KG. **Microbiological and Clinical Aspects of Infection Associated with *Stenotrophomonas maltophilia*.** Clinical Microbiology Reviews, 1998. Disponível em: <<https://journals.asm.org/doi/abs/10.1128/CMR.11.1.57>>. Acesso em: 28 jan. 2022.

DEVRIESE, LA; DE KEYSER, H. **Prevalence of different species of coagulase-negative staphylococci on teats and in milk samples from dairy cows.** The Journal of Dairy Research, v. 47, n. 1, p. 155–158, 1980.

DORES, MT. **Queijo Minas artesanal da Canastra maturado à temperatura ambiente e sob refrigeração.** 2007. Disponível em: <<https://locus.ufv.br/handle/123456789/2856>>. Acesso em: 27 jan. 2022.

DOULGERAKI, AI; ERCOLINI, D; VILLANI, F; *et al.* **Spoilage microbiota associated to the storage of raw meat in different conditions.** International Journal of Food Microbiology, v. 157, n. 2, p. 130–141, 2012.

DRUMOND, SN; SANTIAGO, AF; MOREIRA, M; *et al.* **Identificação molecular de *Escherichia coli* diarreiogênica na Bacia Hidrográfica do Rio Xopotó na região do Alto Rio Doce.** Engenharia Sanitaria e Ambiental, v. 23, p. 579–590, 2018. Disponível em: <<http://www.scielo.br/j/esa/a/NwGQ6P5gRnfNsFs5NHryCkt/abstract/?lang=pt>>. Acesso em: 27 jan. 2022.

DU, M; CHEN, J; ZHANG, X; *et al.* **Retention of Virulence in a Viable but Nonculturable *Edwardsiella tarda* Isolate.** Applied and Environmental Microbiology, v. 73, n. 4, p. 1349–1354, 2007. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1828651/>>. Acesso em: 27 jan. 2022.

DUARTE, DAM.; SCHUCH, DMT.; SANTOS, SB. *et al.* **Pesquisa de *Listeria monocytogenes* e microrganismos indicadores higiênico-sanitários em queijo de coalho produzido e comercializado no estado de Pernambuco.** Instituto Biológico. v.72, p.297- 302, 2005.

ELHADIDY, M; ZAHRAN, E. **Biofilm mediates *Enterococcus faecalis* adhesion, invasion and survival into bovine mammary epithelial cells.** Letters in Applied Microbiology, v. 58, n. 3, p. 248–254, 2014.

EMATER-RS. **Relatório socioeconômico da cadeia produtiva do leite no Rio Grande do Sul.** Porto Alegre. 2017. Disponível em: <<http://biblioteca.emater.tche.br:8080/pergamumweb/vinculos/000006/00000679.pdf>>. Acesso em: 10 de setembro de 2021.

EMBRAPA. **Boas Práticas Agropecuárias para produção de alimentos seguros no campo-Elaboração de manual de boas práticas agropecuárias na produção leiteira.** BRASÍLIA, PAS/EMBRAPA. 26p. (manual técnico). 2005. Acesso em: 10 de setembro de 2021.

EMBRAPA. **Boas Práticas de Fabricação (BPF).** Documentos 120. ISSB: 1516-8247. Maio de 2015. Disponível em: <<https://www.embrapa.br/busca-de-publicacoes/-/publicacao/1028270/boas-praticas-de-fabricacao-bpf>>. Acesso em 10 de setembro de 2021.

ERCOLINI, D. **PCR-DGGE fingerprinting:** novel strategies for detection of microbes in food. *Journal of Microbiological Methods*, v. 56, n. 3, p. 297–314, 2004.

FAGAN, CC; O'CALLAGHAN, DJ; MATEO, MJ; *et al.* Chapter 6 - **The Syneresis of Rennet-Coagulated Curd.** *In:* MCSWEENEY, Paul L. H.; FOX, Patrick F.; COTTER, Paul D.; *et al* (Orgs.). *Cheese (Fourth Edition)*. San Diego: Academic Press, 2017, p. 145–177. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780124170124000065>>. Acesso em: 27 jan. 2022.

FALÇÃO, DA. **Análise da presença de *Enterococcus* sp. resistentes a antimicrobianos isolados de alimentos de Porto Alegre-RS.** Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Disponível em: <<https://lume.ufrgs.br/handle/10183/210796>>.

FAPROGAS. **Regulamento de uso da indicação geográfica na modalidade Denominação de origem Campos de Cima da Serra para Queijo Artesanal Serrano.** 2019.

FERNANDES, LLV. **Produção e qualidade do leite:** um estudo de caso na APELU. 2011. Disponível em: <<https://lume.ufrgs.br/handle/10183/77550>>. Acesso em: 27 jan. 2022.

FERREIRA, EG; FERREIRA, CLLF. **Implicações da madeira na identidade e segurança de queijos artesanais.** *Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes*, v. 66, n. 381, p. 13–20, 2011. Disponível em: <<https://www.revistadoilct.com.br/rilct/article/view/170>>. Acesso em: 27 jan. 2022.

FERREIRA, ESV. **Implementação da norma ISO 22000:2005 numa Indústria de produção de queijo de Azeitão – DOP.** Tese apresentada para obtenção do grau de mestre, Universidade Nova de Lisboa, Faculdade de Ciências e Tecnologia, Grupo de Disciplinas de Ecologia da Hidrosfera. 2010.

FIGUEREDO, EL. **Elaboração e caracterização do “Queijo Marajó”, tipo creme, de leite de búfala, visando sua padronização.** Dissertação (Mestrado em Ciência Animal). Universidade Federal do Pará. Belém, 2006. Disponível em: <https://bit.ly/2V3mPGy>. Acesso em: 25 jul. 2021.

FILTENBORG, O; FRISVAD, J.C.; THRANE, U. **Moulds in food spoilage.** *International Journal of Food Microbiology*, n.33, p.85-102, 1996.

FLORES M; 2003. **História do Rio Grande do Sul**. Porto Alegre: Ediplat.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS (FAO); INTERNATIONAL DAIRY FEDERATION (IDF). **Guia de boas práticas na pecuária de leite**. Roma. (Produção e Saúde Animal Diretrizes, 8). 2013.

FOOD STANDARDS AUSTRALIA NEW ZEALAND - FSANZ. **Microbiological risk assessment of raw milk cheese**: Risk assessment microbiology section. Nova Zelândia: Food Standards Australia New Zealand, 2009. 113 p.

FORSYTHE, SJ. **Microbiologia da segurança dos alimentos**. Porto Alegre: Artmed, 2013.
FOULQUIÉ MORENO, MR; SARANTINOPOULOS, P; TSAKALIDOU, E; *et al.* **The role and application of enterococci in food and health**. International Journal of Food Microbiology, v. 106, n. 1, p. 1–24, 2006.

FOX, P; WALLACE, JM. **Formation of flavor compounds in cheese**. Advances in applied microbiology, 1997.

FOX, PF; GUINEE, TP; COGAN, TM; *et al.* **Bacteriology of Cheese Milk**. Fundamentals of Cheese Science. Boston, MA: Springer US, 2017, p. 105–120. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/978-1-4899-7681-9_5>. Acesso em: 27 jan. 2022.

FOX, PF; GUINEE, TP; COGAN, TM; MCSWEENEY, P.L. **Microbiology of cheese ripening**. In Fundamentals of Cheese Science; Springer: Boston, MA, USA, 2017.

FOX, PF; GUINEE, TP; COGAN, TM; MCSWEENEY, PL. H. **Fundamentals of cheese science**. *Science and Technology*. Doi.org/10.1017/ CBO9781107415324.004. 2017.

FOX, PF; MCSWEENEY, PLH; COGAN, Timothy M.; *et al.* **Fundamentals of Cheese Science**. [s.l.]: Springer Science & Business Media, 2000.

FOX, PF; STEPANIAK, L. **Enzymes in cheese technology**. International Dairy Journal, v. 3, n. 4, p. 509–530, 1993. (Proceedings of the International Dairy Federation Seminar on Cheese Ripening). Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/095869469390029Y>>. Acesso em: 27 jan. 2022.

FRAITAG, MA. **Avaliação da coleta a granel de leite cru refrigerado de propriedades rurais da Região Oeste do Estado de Santa Catarina**. 2015. 28 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) – Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Francisco Beltrão, 2015. Acesso em: 3 fev. 2022.

FRANCO, BDGM; LANDGRAF, M. In: **Microbiologia dos alimentos**. Microrganismos patogênicos de importância em alimentos. Editora Atheneu. São Paulo. 1996.

FRANCO, FPS. (1981). **Processo de Fabrico Queijo de Azeitão**. Disponível em <http://www.azeitao.net/azeitao/queijo/processo_fabrico.htm>.

FRANZ, Charles MAP; HUCH, M; ABRIOUEL, H; *et al.* **Enterococci as probiotics and their implications in food safety.** International Journal of Food Microbiology, v. 151, n.2, p. 125–140, 2011.

FRANZ, CM; SCHILLINGER, U; HOLZAPFEL, WH. **Production and characterization of enterocin 900, a bacteriocin produced by *Enterococcus faecium* BFE 900 from black olives.** International Journal of Food Microbiology, v. 29, n. 2–3, p. 255–270, 1996.

FREITAS FILHO, JR; FILHO, JSS; OLIVEIRA, HB; *et al.* **Avaliação da qualidade do queijo Coalho artesanal fabricado em jucati.** Extensio: Revista Eletrônica de Extensão, v. 6, n. 8, p. 35–49, 2009. Disponível em: <<https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=3231061>>. Acesso em: 3 fev. 2022.

FREITAS, CR; PAULA, RPO; MOREIRA, MAS; *et al.* **Análise da Ocorrência de Resíduos de Antibióticos em Leite Proveniente de Propriedades em Patos de Minas-MG.** Revista Agroveterinária, Negócios e Tecnologias, v. 2, n. 2, p. 08–25, 2017. Disponível em: <<https://ojs.fccvirtual.com.br/index.php/REVISTA-AGRO/article/view/18>>. Acesso em: 27 jan. 2022.

FREITAS, JR; *et al.* **Avaliação dos parâmetros físico-químicos e microbiológicos de queijo coalho comercializado em feiras livres.** Almanaque Multidisciplinar de Pesquisa, v. 7, n. 2, 2020. Disponível em: <<http://publicacoes.unigranrio.edu.br/index.php/amp/article/view/5865>>. Acesso em: 27 jan. 2022.

FRIMAN, MJ; EKLUND, MH; PITKÄLÄ, AH; *et al.* **Description of two *Serratia marcescens* associated mastitis outbreaks in Finnish dairy farms and a review of literature.** Acta Veterinaria Scandinavica, v. 61, n. 1, p. 54, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1186/s13028-019-0488-7>>. Acesso em: 27 jan. 2022.

FRÖHLICH-WYDER, MT. **Yeasts in dairy products.** Yeasts in Food – Beneficial and Detrimental Aspects (Boekhout T. & Robert V, eds), pp. 209–237. 2003. Behr’s Verlag, Hamburg

FRÖHLICH-WYDER, M-T; ARIAS-ROTH, E; JAKOB, E. **Cheese yeasts.** Yeast, v. 36, n. 3, p. 129–141, 2019. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/yea.3368>>. Acesso em: 3 fev. 2022.

FUNGOS DO BRASIL. Disponível em: <<http://www.cybertruffle.org.uk/brazfung/por/index.htm>>. Acesso em: 28 jan. 2022.

FURTADO, MM. **Principais problemas dos queijos: causas e prevenção.** Edição Revisada e Ampliada. São Paulo: Fonte Comunicação e Editora, 2005. 200 p.

GANESAN B; IRISH K.B.D; MCMAHON J.D. **Manufacture and sensory analysis of reduced and low sodium Cheddar and Mozzarella cheeses.** Journal of Dairy Science, v.97, n; 4, p.1980-1982, 2014.

GARCÍA FONTÁN, MC; FRANCO, I; PRIETO, B; *et al.* **Microbiological changes in ‘San Simón’ cheese throughout ripening and its relationship with physico-chemical**

parameters. Food Microbiology, v. 18, n. 1, p. 25–33, 2001. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0740002000903514>>. Acesso em: 27 jan. 2022.

GARCIA, GAC; PENNA, ALB. **Queijo Prato com teor reduzido de gordura adicionado de enzima proteolítica:** características físicas e sensoriais. Revista do Instituto Adolfo Lutz, v. 69, n. 3, p. 346–357, 2010. Disponível em: <<https://periodicos.saude.sp.gov.br/index.php/RIAL/article/view/32636>>. Acesso em: 27 jan. 2022.

GAVA, AJ; SILVA, CAB; FRIAS, JRG. **Tecnologia de alimentos princípios e aplicações.** São Paulo: Nobel, 2008.

GELSOMINO, R; VANCANNEYT, M; CONDON, S; *et al.* **Enterococcal diversity in the environment of an Irish Cheddar-type cheesemaking factory.** International Journal of Food Microbiology, v. 71, n. 2–3, p. 177–188, 2001.

GIRAFFA, G.; CARMINATI, D.; NEVIANI, E. **Enterococci isolated from dairy products: a review of risks and potential technological use.** Journal of Food Protection, v. 60, p. 732 – 738, 1997.

GIRAFFA, Giorgio. **Enterococci from foods.** FEMS microbiology reviews, v. 26, n. 2, p. 163–171, 2002.

GIRAFFA, Giorgio. **Functionality of enterococci in dairy products.** International Journal of Food Microbiology, v. 88, n.2, p. 215–222, 2003. (Enterococci in Foods. Functional and Safety Aspects). Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0168160503001831>>. Acesso em: 28 jan. 2022.

GKATZIONIS, K; YUNITA, D; LINFORTH, RST; *et al.* **Diversity and activities of yeasts from different parts of a Stilton cheese.** International Journal of Food Microbiology, v. 177, p. 109–116, 2014. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24631634/>>. Acesso em: 28 jan. 2022.

GOBBETTI, M; NEVIANI, E; FOX, P. The Distinguishing Features of Italian Cheese Manufacture. *In:* GOBBETTI, Marco; NEVIANI, Erasmo; FOX, Patrick (Orgs.). **The Cheeses of Italy: Science and Technology.** Cham: Springer International Publishing, 2018, p. 61–97. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/978-3-319-89854-4_5>. Acesso em: 3 fev. 2022.

GOMES, F; HENRIQUES, M. **Control of Bovine Mastitis:** Old and Recent Therapeutic Approaches. Current Microbiology, v. 72, n.4, p. 377–382, 2016.

GONÇALVES, RBO; BARBOSA, FFD; ARECO, AET; *et al.* **Características microbiológicas, celulares, físicas e químicas de leite cru refrigerado em Aparecida do Taboado-MS/ Microbiological, cellular, physical and chemical characteristics of refrigerated raw milk in Aparecida Do Taboado-MS.** Brazilian Journal of Development, v. 6, n. 2, p. 7290–7300, 2020. Disponível em: <<https://brazilianjournals.com/index.php/BRJD/article/view/6879>>. Acesso em: 27 jan. 2022.

GUEDES NETO, LG; SANTOS, WLM. **Produção de queijo de coalho em Pernambuco: isolamento e identificação de *Staphylococcus* spp e de bactérias ácido lácticas e de sua atividade antagonista in-vitro.** Belo Horizonte UFMG – EV, 2004.

GUIMARÃES, GM; MATEUS, LS; MORAES, AIP; *et al.* **Qualidade do leite in natura perante a instrução normativa IN 76 do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento do Brasil.** Research, Society and Development, v. 9, n. 9, p. e262996746–e262996746, 2020. Disponível em: <<https://rsdjournal.org/index.php/rsd/article/view/6746>>. Acesso em: 27 jan. 2022.

GUZMAN PRIETO, AM; VAN SCHAIK, W; ROGERS, MRC; *et al.* **Global Emergence and Dissemination of Enterococci as Nosocomial Pathogens: Attack of the Clones?** Frontiers in Microbiology, v. 7, p. 788, 2016.

HAN, H; SCHEPARTZ, A; PELLEGRINI, M; *et al.* **Mapping RNA regions in eukaryotic ribosomes that are accessible to methidiumpropyl-EDTA.** Fe (II) and EDTA.Fe (II). Biochemistry, v. 33, n. 33, p. 9831–9844, 1994.

HEIM, S; LLEO, MM; BONATO, B; *et al.* **The viable but nonculturable state and starvation are different stress responses of *Enterococcus faecalis*, as determined by proteome analysis.** Journal of Bacteriology, v. 184, n. 23, p. 6739–6745, 2002.

HELLAL, A; AMROUCHE, L; FERHAT, Z; *et al.* **Characterization of bacteriocin from *Lactococcus* isolated from traditional Algerian dairy products.** Annals of Microbiology, v. 62, n. 1, p. 177–185, 2012. Disponível em: <<https://annalsmicrobiology.biomedcentral.com/articles/10.1007/s13213-011-0244-3>>. Acesso em: 27 jan. 2022.

HERNANDEZ-DUQUINO, H; ROSENBERG, FA. **Antibiotic-resistant *Pseudomonas* in bottled drinking water.** Canadian Journal of Microbiology, v. 33, n.4, p. 286–289, 1987.

HIRZEL, W. **Implicancias del *Staphylococcus saprophyticus* en la patología infecciosa urinaria de la mujer.** Acta bioquím. clín. latinoam, p. 217–220, 2004. Disponível em: <http://www.scielo.org.ar/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0325-29572004000200012>. Acesso em: 28 jan. 2022.

HOEGL, L; SCHÖNIAN, G; OLLERT, M; *et al.* ***Candida sake*: a relevant species in the context of HIV-associated oropharyngeal candidosis?** Journal of Molecular Medicine (Berlin, Germany), v. 76, n. 1, p. 70–73, 1998.

HOGAN, JS; BOGACZ, VL; THOMPSON, LM; *et al.* **Bacterial counts associated with sawdust and recycled manure bedding treated with commercial conditioners.** Journal of Dairy Science, v. 82, n. 8, p. 1690–1695, 1999.

HOLZAPFEL, W; ARINI, A; AESCHBACHER, M; *et al.* ***Enterococcus faecium* SF68 as a model for efficacy and safety evaluation of pharmaceutical probiotics.** Beneficial Microbes, v. 9, n. 3, p. 375–388, 2018.

IDE, LPA; BENEDET, HD. **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. Acesso em: 25 jul. 2021.

IDRISS, SE; FOLTYS, V; TANČIN, V; *et al.* **Mastitis pathogens in milk of dairy cows in Slovakia**. *Slovak Journal of Animal Science*, v. 46, n. 3, p. 115–119, 2013. Disponível em: <<https://sjas.ojs.sk/sjas/article/view/255>>. Acesso em: 28 jan. 2022.

ILLUMINA. **An introduction to Next-Generation Sequencing Technology**. Nota Técnica. Pub. No. 770-2012-008-B, 2017. Disponível em: www.illumina.com/technology/next-generation-sequencing.html. Acessado em: 21 de outubro de 2021.

İSPIRLI, H; DEMIRBAŞ, F; DERTLI, E. **Characterization of functional properties of *Enterococcus* spp. isolated from Turkish white cheese**. *LWT*, v. 75, p. 358–365, 2017. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0023643816305722>>. Acesso em: 27 jan. 2022.

JAGADEESAN, B. *et al.* **The use of next generation sequencing for improving food safety: Translation into practice**. *Food microbiology*, v. 79, p. 96-115, 2018.

JAKOBSEN, M; NARVHUS, J. **Yeasts and their possible beneficial and negative effects on the quality of dairy products**. *International Dairy Journal*, v.6, n.8-9, p.755-768, ago. 1996.

JAY, JM. **Microbiologia de Alimentos**. 6ª edição, editora Artmed, p.517-542, Porto Alegre, 2005.

JAY, JM.; LOESSNER, M. J.; GOLDEN, D. A. **Modern food microbiology**. 7ed. New York: Springer, 2005.

JODRAL, M. *et al.* **Mycoflora and toxigenic *Aspergillus flavus* in Spanish milk**. *International Journal of Food Microbiology*, v.18, p.171-174, 1993.

JONNALA, BRY; MCSWEENEY, PLH; SHEEHAN, JJ; COTTER, PD. **Sequencing of the Cheese Microbiome and Its Relevance to Industry**. *Frontiers in Microbiology*, 9, 1020. 2018. PMID:29875744. doi:<<http://dx.doi.org/10.3389/fmicb.2018.01020>>.

JUFFS, HS. **Identification of *Pseudomonas* spp. isolated from milk produced in South Eastern Queensland**. *Journal of Applied Bacteriology*, v. 36, n. 4, p. 585–598, 1973. Disponível em: <<https://eurekamag.com/research/000/111/000111293.php>>. Acesso em: 28 jan. 2022.

JUHNKE, ME; DES JARDIN, E. **Selective medium for isolation of *Xanthomonas maltophilia* from soil and rhizosphere environments**. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 55, n. 3, p. 747–750, 1989. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC184190/>>. Acesso em: 28 jan. 2022.

JÚNIOR, JCR; BELOTI, V; SILVA, LCC; *et al.* **Avaliação da qualidade microbiológica e físico-química do leite cru refrigerado produzido na região de Ivaiporã, Paraná**. *Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes*, v. 68, n. 392, p. 5–11, 2013. Disponível em: <<https://www.revistadoilct.com.br/rilct/article/view/23>>. Acesso em: 27 jan. 2022.

KATHOLM, J; BENNEDSGAARD, TW; KOSKINEN, MT; RATTENBORG, E. **Quality of bulk tank milk samples from Danish dairy herds based on real-time polymerase chain reaction identification of mastitis pathogens.** *J Dairy Sci.* 2012;95:5702–5708. doi: 10.3168/jds.2011-5307. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22921631/>>.

KAUSHIK, R; BALASUBRAMANIAN, R. **Discrimination of viable from non-viable Gram-negative bacterial pathogens in airborne particles using propidium monoazide-assisted qPCR.** *Science of The Total Environment*, v. 449, p. 237–243, 2013. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0048969713001204>>. Acesso em: 27 jan. 2022.

KHAN, MZ; KHAN, A. **Basic facts of mastitis in dairy animals: A review.** *Pakistan Veterinary Journal.* (Pakistan), 2006.

KHATTAB, AR; GUIRGUIS, HA; TAWFIK, SM; *et al.* **Cheese ripening: A review on modern technologies towards flavor enhancement, process acceleration and improved quality assessment.** *Trends in Food Science & Technology*, v. 88, p. 343–360, 2019. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0924224419300597>>. Acesso em: 27 jan. 2022.

KLANČNIK, A; TOPLAK, N; KOVAČ, M; *et al.* **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.

KLEEREBEZEM, M; HUGENHOLTZ, J. **Metabolic pathway engineering in lactic acid bacteria.** *Current Opinion in Biotechnology*, v. 14, n.2, p. 232–237, 2003.

KORAKHASHVILI, A; JEIRANASHVILI, G. **Food safety hazards in Georgian Tushuri Guda cheese.** *Annals of Agrarian Science*, v. 14, n. 3, 2016. Disponível em: <<https://cyberleninka.org/article/n/1428797>>. Acesso em: 27 jan. 2022.

KOZICH, JJ.; WESTCOTT, SL.; BAXTER, NT.; *et al.* **Development of a dual-index sequencing strategy and curation pipeline for analyzing amplicon sequence data on the MiSeq Illumina sequencing platform.** *Applied and Environmental Microbiology*, v. 79, n. 17, p. 5112–5120, 2013.

KRONE, EE. **Identidade e cultura nos Campos de Cima da Serra (RS): práticas, saberes e modos de vida de pecuaristas familiares produtores do queijo serrano.** 2009. Disponível em: <<https://lume.ufrgs.br/handle/10183/22659>>. Acesso em: 27 jan. 2022.

KULSKI, JK. **Next-Generation Sequencing — An Overview of the History, Tools, and “Omic” Applications,** (2016), Disponível em: <<https://www.intechopen.com/chapters/49602>>.

KUPFER, DM. *et al.* **Multicellular Ascomycetous Fungal Genomes Contain More Than 8000 Genes.** *Fungal Genetics and Biology*, v.21, n.3, p.364-372, jun. 1997.

LACHANCE, M-A. (2011). **The Yeasts || *Candida*.** (), 987–1278. doi:10.1016/B978-0-444-52149-1.00090-2. 2011.

LACOSTE, P. Genesis and identity of Chanco cheese (Chile 1750-1860). **A contribution to studies on Appellations of Origin in Latin America**. Disponível em: <https://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci_abstract&pid=S071816202014000300004&lng=es&nrm=iso&tlng=en>. Acesso em: 27 jan. 2022.

LAHTINEN, S; OUWEHAND, AC; SALMINEN, S; *et al* (Orgs.). **Lactic Acid Bacteria: Microbiological and Functional Aspects**, Fourth Edition. 4. ed. Boca Raton: CRC Press, 2012.

LAISSUE, JA; CHAPPUIS, BB; MÜLLER, C; *et al*. **The intestinal immune system and its relation to disease**. Digestive Diseases (Basel, Switzerland), v. 11, n. 4–5, p. 298–312, 1993.

LAKEW, BT; FAYERA, T; ALI, YM. **Risk factors for bovine mastitis with the isolation and identification of Streptococcus agalactiae from farms in and around Haramaya district, eastern Ethiopia**. Tropical Animal Health and Production, v. 51, n. 6, p. 1507–1513, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s11250-019-01838-w>>. Acesso em: 28 jan. 2022.

LANGE, CC; BRITO, MAVP; REIS, DRL; *et al*. **Species-level identification of staphylococci isolated from bovine mastitis in Brazil using partial 16S rRNA sequencing**. Veterinary Microbiology, v. 176, n. 3–4, p. 382–388, 2015.

LANGE, MJ; ZAMBOM, MA; POZZA, MSS.; *et al*. **Tipologia de manejo de ordenha: análise de fatores de risco para a mastite subclínica**. Pesquisa Veterinária Brasileira, v. 37, p. 1205–1212, 2017. Disponível em: <<http://www.scielo.br/j/pvb/a/wYSvYfHbCbChLrX4nKCynZk/?lang=pt>>. Acesso em: 27 jan. 2022.

LAVOIE, K; TOUCHETTE, M; ST-GELAIS, Daniel; *et al*. **Characterization of the fungal microflora in raw milk and specialty cheeses of the province of Quebec**. Dairy Science & Technology, v. 92, n. 5, p. 455–468, 2012. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s13594-011-0051-4>>. Acesso em: 31 jan. 2022.

LAVOR, L; GUIMARÃES, FF; SALINA, A; *et al*. **Bacterial identification, somatic cell count, antimicrobial profile and toxigenic Staphylococcus strains search from mastitic cow milk samples on small farms properties**. Pesquisa Veterinária Brasileira, v. 39, p. 715–722, 2019. Disponível em: <<http://www.scielo.br/j/pvb/a/9PFBkQpfbh8NwgdFHpJ7xLF/abstract/?lang=en>>. Acesso em: 27 jan. 2022.

LECLERCQ-PERLAT, MN; SICARD, M; PERROT, N; *et al*. **Temperature and relative humidity influence the ripening descriptors of Camembert-type cheeses throughout ripening**. Journal of Dairy Science, v. 98, n. 2, p. 1325–1335, 2015.

LEE, KM; RUNYON, M; HERRMAN, TJ; *et al*. **Review of Salmonella detection and identification methods: Aspects of rapid emergency response and food safety**. Food Control, v. 47, p. 264–276, 2015. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0956713514003879>>. Acesso em: 27 jan. 2022.

LEIRA, MH; BOTELHO, HA; SANTOS, HCAS; *et al.* **Fatores que alteram a produção e a qualidade do leite:** Revisão. PUBVET, v. 12, p. 172, 2018. Disponível em: <<http://www.pubvet.com.br/artigo/4780/fatores-que-alteram-a-produccedilatildeo-e-a-qualidade-do-leite-revisatildeo>>. Acesso em: 27 jan. 2022.

LEMPK, MW. **Caracterização físico-química, microbiológica e tecnológica do queijo artesanal da microrregião de Montes Claros - MG.** Mestrado em Ciências Agrárias do Instituto de Ciências Agrárias da Universidade Federal de Minas Gerais. Disponível em: <<https://repositorio.ufmg.br/handle/1843/NCAP-974PYC>>.

LEROY, F; DE VUYST. **Lactic acid bacteria as functional starter cultures for the food fermentation industry.** Trends in Food Science & Technology, v. 15, n. 2, p. 67–78, 2004. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0924224403002085>>. Acesso em: 27 jan. 2022.

LEVINSON, W. (2010). **Review of Medical Microbiology and Immunology** (11th ed.). pp. 94–99.

LI, L; MENDIS, N; TRIGUI, H; *et al.* **The importance of the viable but non-culturable state in human bacterial pathogens.** Frontiers in Microbiology, v. 5, 2014. Disponível em: <<https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fmicb.2014.00258>>. Acesso em: 27 jan. 2022.

LIMA, BB; LEAL, MC. **Parâmetros indicadores de qualidade de queijos artesanais comercializados em Castro-PR. 2017, 30f.** Trabalho de Conclusão de Curso (Tecnologia de Alimentos) - Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Ponta Grossa, 2017.

LIU, J; MU, T; HE, W; *et al.* **Integration of coagulation, acid separation and struvite precipitation as fermentation medium conditioning methods to enhance microbial lipid production from dewatered sludge.** Bioresource Technology Reports, v. 7, p. 100221, 2019. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S2589014X19301112>>. Acesso em: 28 jan. 2022.

LONCAREVIC, S; JØRGENSEN, HJ; LØVSETH, A; *et al.* **Diversity of *Staphylococcus aureus* enterotoxin types within single samples of raw milk and raw milk products.** Journal of Applied Microbiology, v. 98, n. 2, p. 344–350, 2005.

LOUVATEL, K; DEGENHARDT, R. **Caracterização bromatológica de queijos coloniais produzidos no distrito de santa lúcia, município de Ouro, SC.** Jornada Integrada em Biologia, p. 37–46, 2016. Disponível em: <<https://portalperiodicos.unoesc.edu.br/jornadaintegradaembilogia/article/view/10306>>. Acesso em: 27 jan. 2022.

LUCAS, SDM.; SCALCO, A; FELDHAUS, S; *et al.* **Padrão de identidade e qualidade de queijos colonial e prato, comercializados na cidade de medianeira - PR.** Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes, v. 67, n. 386, p. 38–44, 2012. Disponível em: <<https://www.revistadoilct.com.br/rilct/article/view/235>>. Acesso em: 27 jan. 2022.

MA, Y; RYAN, C; BARBANO, DM; *et al.* **Effects of somatic cell count on quality and shelf-life of pasteurized fluid milk.** Journal of Dairy Science, v. 83, n. 2, p. 264–274, 2000.

Disponível em: <[https://www.journalofdairyscience.org/article/S0022-0302\(00\)74873-9/fulltext](https://www.journalofdairyscience.org/article/S0022-0302(00)74873-9/fulltext)>.

MACÉ, S; JOFFRAUD, JJ; CARDINAL, M; *et al.* **Evaluation of the spoilage potential of bacteria isolated from spoiled raw salmon (*Salmo salar*) fillets stored under modified atmosphere packaging.** International Journal of Food Microbiology, v. 160, n. 3, p. 227–238, 2013. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S016816051200551X>>. Acesso em: 27 jan. 2022.

MACHADO, ABS. **Avaliação do pH e verificação da sua relação com o desenvolvimento de microrganismos no queijo de Azeitão ao longo do processo de maturação.** Dissertação Mestre em Medicina Veterinária no Curso de Mestrado em Medicina Veterinária. Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias. 2020. Disponível em: <<https://recil.ensinulusofona.pt/handle/10437/11938>>.

MADERA, C; GARCÍA, P; JANZEN, T; *et al.* **Characterisation of technologically proficient wild *Lactococcus lactis* strains resistant to phage infection.** International Journal of Food Microbiology, v. 86, n. 3, p. 213–222, 2003.

MADIGAN, M; MARTINKO, J; PARKER, J. **Brock biology of microorganisms.** Upper Saddle River: Prentice Hall. 11.ed. 992p. 2005.

MAGALHÃES, Mirella Araújo *et al.* **Implantação das boas práticas de fabricação em uma indústria de laticínios da zona da Mata Mineira.** 2011. In: Congresso Brasileiro de Qualidade. Disponível em: <<http://www.terraviva.com.br/IICBQL/p005.pdf>>. Acesso em: 25 jul. 2021.

MAHONY, J; BOTTACINI, F; VAN SINDEREN, D; *et al.* **Progress in lactic acid bacterial phage research.** Microbial Cell Factories, v. 13, n. 1, p. S1, 2014. Disponível em: <<https://doi.org/10.1186/1475-2859-13-S1-S1>>. Acesso em: 27 jan. 2022.

MARIOTO, LRM; DANIEL, GC; GONZAGA, N; *et al.* **Potencial deteriorante da microbiota mesófila, psicrotrófica, termodúrica e esporulada do leite cru.** Ciência Animal Brasileira, v. 21, 2020. Disponível em: <<http://www.scielo.br/j/cab/a/5scPhJrpH7kwprxMzJbnRvg/?lang=pt>>. Acesso em: 27 jan. 2022.

MARTIN, JD; MUNDT, JO. **Enterococci in insects.** Applied Microbiology, v. 24, n. 4, p. 575–580, 1972.

MARTÍNEZ-VASALLO, A; RIBOT-ENRÍQUEZ, A; RIVERÓN-ALEMÁN, Y; *et al.* ***Staphylococcus aureus* in the production chain of artisan fresh cheese.** Revista de Salud Animal, v. 41, n. 1, 2019. Disponível em: <http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_abstract&pid=S0253-570X2019000100007&lng=es&nrm=iso&tlng=en>. Acesso em: 27 jan. 2022.

MARTINS, JD; NICOLAU, EAS; MESQUITA, AJ; *et al.* **Mastite subclínica em rebanhos leiteiros de propriedades rurais de Goiás.** Revista Brasileira de Higiene e Sanidade Animal, v. 9, n. 2, p. 206–214, 2015. Disponível em:

<<http://www.higieneanimal.ufc.br/seer/index.php/higieneanimal/article/view/236>>. Acesso em: 2 fev. 2022.

MARTINS, JM. **Características físico-químicas e microbiológicas durante a maturação do queijo Minas artesanal da Região do Serro**. Tese (Doutorado em Ciência e Tecnologia de Alimentos). Viçosa, MG: UFV, 158p. 2006.

MASELLA, AP; BARTRAM, AK; TRUSZKOWSKI, JM. *et al.* **PANDAseq: paired-end assembler for illumina sequences**. BMC Bioinformatics, v. 13, n. 1, p. 31, 2012. Disponível em: <<https://doi.org/10.1186/1471-2105-13-31>>. Acesso em: 27 jan. 2022.

MATOS, JS; WHITE, DG; HARMON, RJ; *et al.* **Isolation of *Staphylococcus aureus* from Sites Other than the Lactating Mammary Gland**. Journal of Dairy Science, v. 74, n. 5, p. 1544–1549, 1991. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S002203029178315X>>. Acesso em: 28 jan. 2022.

MATOS, LM. **Avaliação da aplicação de boas práticas agropecuárias (BPA) na ordenha sobre a qualidade do leite bovino, em propriedades produtoras de queijo artesanal serrano**. 2013. Disponível em: <<https://lume.ufrgs.br/handle/10183/80754>>. Acesso em: 27 jan. 2022.

MCSWEENEY, PLH. (Org.). **The microbiology of cheese ripening**. In: Cheese Problems Solved. [s.l.]: Woodhead Publishing, 2007, p. 117–132. (Woodhead Publishing Series in Food Science, Technology and Nutrition). Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9781845690601500107>>. Acesso em: 27 jan. 2022.

MEIER, GOS; COSTA, PV; ROSAS, CO; *et al.* **Avaliação da qualidade microbiológica e físico-química de queijos maturados produzidos com leite cru**. Revista Científica do UBM, p. 180–192, 2021. Disponível em: <<http://revista.ubm.br/index.php/revistacientifica/article/view/877>>. Acesso em: 27 jan. 2022.

MELO, DS. **Avaliação da qualidade de leite cru produzido no Alto Sertão Sergipano frente aos parâmetros legais preconizados pela legislação**. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Agroindústria) – Universidade Federal de Sergipe, Nossa Senhora da Glória, 2020.

MELO, FD. *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: 25 jul. 2021.

MENDES, DPG; SOUZA, MR; GALLETI JÚNIOR, M; *et al.* **Quality of fermented milks produced with *Lactobacillus rhamnosus* and *Lactobacillus fermentum* isolated from artisanal cheeses**. Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia, v. 66, p. 1291–1295, 2014. Disponível em: <<http://www.scielo.br/j/abmvz/a/rNB9Xktz3gnHcfyTLzKXNzh/?lang=en>>. Acesso em: 27 jan. 2022.

MENEGOL, MV; DORNELLES, S; BAIROS, F; *et al.* **Rancidez hidrolítica e oxidativa em queijos da serra gaúcha e sua relação com parâmetros nutricionais e microbiológicos.** *Disciplinarum Scientia | Saúde*, v. 21, n. 1, p. 199–211, 2020. Disponível em: <<https://periodicos.ufn.edu.br/index.php/disciplinarumS/article/view/3152>>. Acesso em: 27 jan. 2022.

MENG, Z; ZHANG, L; XIN, L; *et al.* **Technological characterization of Lactobacillus in semihard artisanal goat cheeses from different Mediterranean areas for potential use as nonstarter lactic acid bacteria.** *Journal of Dairy Science*, v. 101, n. 4, p. 2887–2896, 2018. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S002203021830095X>>. Acesso em: 27 jan. 2022.

MICALLEF, SA; GOLDSTEIN, RR; GEORGE, A; *et al.* **Diversity, distribution and antibiotic resistance of *Enterococcus* spp. recovered from tomatoes, leaves, water and soil on U.S. Mid-Atlantic farms.** *Food Microbiology*, v. 36, n. 2, p. 465–474, 2013.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Resolução RDC N.º 259 de 20 de setembro de 2022.** Disponível em: <https://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/2002/rdc0259_20_09_2002.html>. Acesso em: 3 fev. 2022.

MOLINA, CHA; CENTENARO, GS; FURLAN, VJM. **Qualidade do leite cru comercializado informalmente no município de Itaqui-RS.** *Vigilância Sanitária em Debate*, v. 3, n. 4, p. 106–113, 2015. Disponível em: <<https://visaemdebate.incqs.fiocruz.br/index.php/visaemdebate/article/view/492>>. Acesso em: 27 jan. 2022.

MOLONEY, AP; FIEVEZ, V; MARTIN, B; *et al.* **Botanically diverse forage-based rations for cattle: implications for product composition, product quality and consumer health.** *In: HOPKINS, A.; GUSTAFSSON, T.; BERTILSSON, J.; et al (Orgs.). Grassland Science in Europe Vol 13: Biodiversity and Animal Feed: Future Challenges for Grassland production.* [s.l.]: European Grassland Federation, 2008, v. 13, p. 361–374.

MONNET, C; LANDAUD, S; BONNARME, P., & SWENNEN, D. (2014). **Growth and adaptation of microorganisms on the cheese surface.** *FEMS Microbiology Letters*, 263, 1-9.

MONTEL, M-C; BUCHIN, S; MALLET, A; *et al.* **Traditional cheeses: Rich and diverse microbiota with associated benefits.** *International Journal of Food Microbiology*, v. 177, p. 136–154, 2014. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0168160514001068>>. Acesso em: 31 jan. 2022.

MORAES, PM. **Identificação molecular de bactérias ácido lácticas isoladas de leite cru e queijo, e pesquisa de genes de bacteriocinas.** 2011. 76 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2011.

MOTTA, RG. *et al.* **Indicadores de qualidade e composição de leite informal comercializado na região sudeste do estado de São Paulo.** *Pesquisa Veterinária Brasileira*, v. 35, n. 5, p. 417-423, 2015.

MÜLLER, T; ULRICH, A; OTT, EM; *et al.* **Identification of plant-associated enterococci.** Journal of Applied Microbiology, v. 91, n. 2, p. 268–278, 2001.

MULLIS, K; FALOONA, F; SCHARF, S; *et al.* **Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction.** Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology, v. 51 Pt 1, p. 263–273, 1986.

MUNDT, JO. **Occurrence of enterococci on plants in a wild environment.** Applied Microbiology, v. 11, p. 141–144, 1963.

MURPHY, SC; MARTIN, NH; BARBANO, DM; *et al.* **Influence of raw milk quality on processed dairy products: How do raw milk quality test results relate to product quality and yield?** Journal of Dairy Science, v. 99, n. 12, p. 10128–10149, 2016.

MURUGESAN, S; REYES-MATA, MP; NIRMALKAR, K; *et al.* **Profiling of bacterial and fungal communities of Mexican cheeses by high throughput DNA sequencing.** Food Research International (Ottawa, Ont.), v. 113, p. 371–381, 2018.

NAKATSU, CH; FULTHORPE, RR; HOLLAND, BA; *et al.* **The phylogenetic distribution of a transposable dioxygenase from the Niagara River watershed.** Molecular Ecology, v. 4, n. 5, p. 593–603, 1995.

NAKAZATO, T; OHTA, T; BONO, H. **Experimental design-based functional mining and characterization of high-throughput sequencing data in the sequence read archive.** PloS One, v. 8, n. 10, p. e77910, 2013.

NASSU, RT. *et al.* **Diagnóstico das condições de processamento de produtos regionais derivados do leite no Estado do Ceará.** Embrapa Agroindústria Tropical. Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento, 2001.

NEVES, LF; FONSECA, HC; OLIVEIRA, MLP; *et al.* **Perfil físico-químico de queijos artesanais do norte de Minas Gerais.** Revista Unimontes Científica, v. 23, n. 1, p. 1–10, 2021. Disponível em: <<https://www.periodicos.unimontes.br/index.php/unicientifica/article/view/4325>>. Acesso em: 27 jan. 2022.

NIGAM, A; KNOERS, NVAM; RENKEMA, KY. **Impact of next generation sequencing on our understanding of CAKUT.** Seminars in Cell & Developmental Biology, v. 91, p. 104–110, 2019.

NOKELS, L; FAHMY, T; CROCHEMORE, S. **Interpretation of the Preferences of Automotive Customers Applied to Air Conditioning Supports by Combining GPA and PLS Regression.** Handbook of Partial Least Squares: Concepts, Methods and Applications. Berlin, Heidelberg: Springer, 2010, p. 775–789. (Springer Handbooks of Computational Statistics). Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/978-3-540-32827-834>>. Acesso em: 27 jan. 2022.

NORONHA, JF. **Segurança alimentar dos queijos tradicionais.** Disponível em: http://www.esac.pt/noronha/manuais/seguranca_alimentar_queijos.pdf. Acesso em: 25 jul. 2021.

NOVICK, RP. **Autoinduction and signal transduction in the regulation of staphylococcal virulence.** *Molecular Microbiology*, v. 48, n. 6, p. 1429–1449, 2003.

NOWAKIEWICZ, A; ZIÓLKOWSKA, G; TROŚCIAŃCZYK, A; *et al.* **Determination of antimicrobial resistance of *Enterococcus* strains isolated from pigs and their genotypic characterization by method of amplification of DNA fragments surrounding rare restriction sites (ADSRRS fingerprinting).** *Journal of Medical Microbiology*, v. 66, n.2, p. 175–183, 2017.

NUNES, RCS; SOUZA, CP; PEREIRA, KS; *et al.* **Identification and molecular phylogeny of coagulase-negative staphylococci isolates from Minas Frescal cheese in southeastern Brazil: Superantigenic toxin production and antibiotic resistance.** *Journal of Dairy Science*, v. 99, n. 4, p. 2641–2653, 2016. Disponível em: <[https://www.journalofdairyscience.org/article/S0022-0302\(16\)00084-9/fulltext](https://www.journalofdairyscience.org/article/S0022-0302(16)00084-9/fulltext)>. Acesso em: 2 fev. 2022.

O'DRISCOLL, T; CRANK, CW. **Vancomycin-resistant enterococcal infections: epidemiology, clinical manifestations, and optimal management.** *Infection and Drug Resistance*, v. 8, p. 217–230, 2015.

OCAK, E; JAVIDIPOUR, I; TUNCTURK, Y. **Volatile compounds of Van Herby cheeses produced with raw and pasteurized milks from different species.** *Journal of Food Science and Technology*, v. 52, n. 7, p. 4315–4323, 2015. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4486542/>>. Acesso em: 27 jan. 2022.

OHNISHI, M; SAWADA, T; MARUMO, K; *et al.* **Antimicrobial susceptibility and genetic relatedness of bovine *Stenotrophomonas maltophilia* isolates from a mastitis outbreak.** *Letters in Applied Microbiology*, v. 54, n. 6, p. 572–576, 2012.

OLIVEIRA, ENA; SANTOS, DC. **Avaliação da qualidade físico-química de leites pasteurizados.** *Revista Instituto Adolfo Lutz*, 2012.

OLIVEIRA, LG. **Caracterização microbiológica e físico-química durante a maturação em diferentes épocas do ano de queijo Minas artesanal de produtores cadastrados da mesorregião de Campo das Vertentes - MG. 2014.** Disponível em: <<https://repositorio.ufmg.br/handle/1843/SMOC-9NYJD6>>. Acesso em: 27 jan. 2022.

OLIVEIRA, LMA; ANJOS, LMJ; SOUZA, PRR; *et al.* **Avaliação da qualidade de queijos ralados para proteção à saúde pública.** *Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes*, v. 67, n. 384, p. 41–47, 2012. Disponível em: <<https://www.revistadoilct.com.br/rilct/article/view/196>>. Acesso em: 27 jan. 2022.

ORDIALES, E; BENITO, MJ; MARTÍN, A; *et al.* **Bacterial communities of the traditional raw ewe's milk cheese “Torta del Casar” made without the addition of a starter.** *Food Control*, v. 33, n. 2, p. 448–454, 2013. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0956713513001497>>. Acesso em: 27 jan. 2022.

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

PACHOUD, C; COY, M. **Relações de proximidade entre atores locais e as dinâmicas de desenvolvimento territorial: análise da cadeia produtiva do queijo artesanal serrano nos campos de cima da serra/RS**. Revista Brasileira de Gestão e Desenvolvimento Regional, v. 14, n. 2, 2017. Disponível em: <<https://www.rbgdr.net/revista/index.php/rbgdr/article/view/3589>>. Acesso em: 27 jan. 2022.

PAN, GG; KILMARTIN, PA; SMITH, BG; *et al.* **Detection of orange juice adulteration by tangelo juice using multivariate analysis of polymethoxylated flavones and carotenoids**. Journal of the Science of Food and Agriculture, v. 82, n. 4, p. 421–427, 2002. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/jsfa.1051>>. Acesso em: 27 jan. 2022.

PARANHOS, TS. **Caracterização de bactérias presentes na carne bovina utilizando o sequenciamento da região V3/V4 do gene 16S rRNA**. Trabalho de Conclusão do Curso de Graduação em Engenharia de Alimentos, Departamento de Engenharia Química e Engenharia de Alimentos do Centro Tecnológico da Universidade Federal de Santa Catarina.

PEREIRA, FEV. **Isolamento e caracterização de microrganismos em leite cru refrigerado e leite UHT no estado de Goiás e desenvolvimento de filme ativo antimicrobiano para inibição de *Bacillus sporothermodurans***. 2010. Disponível em: <<http://repositorio.bc.ufg.br/tede/handle/tede/1451>>. Acesso em: 27 jan. 2022.

PEREIRA, TMF; GÓIS, VA; SOARES, KMP; SOUZA, LB; SOUSA, JA. ***Staphylococcus aureus* and *Salmonella* sp. in curd cheese produced in São Rafael, Rio Grande do Norte**. Revista Verde de Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável. V.12, N.º 2, p. 358-361, 2017. Doi: <https://doi.org/10.18378/rvads.v12i2.4829>. Disponível em: <<https://www.gvaa.com.br/revista/index.php/RVADS/article/view/4829>>.

PERES, JR. **O leite como ferramenta do monitoramento nutricional**. In: FÉLIX, H.D. (Ed.). *Uso do leite para monitorar a nutrição e o metabolismo de vacas leiteiras*. Porto Alegre: Gráfica da UFRGS, 2001. p.30-45.

PERIN, LM; MIRANDA, RO; TODOROV, SD; *et al.* **Virulence, antibiotic resistance and biogenic amines of bacteriocinogenic lactococci and enterococci isolated from goat milk**. International journal of food microbiology, v. 185, p. 121–126, 2014. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2014.06.001>>. Acesso em: 27 jan. 2022.

PERSSON, Y; NYMAN, A-K J.; GRÖNLUND-ANDERSSON, U. **Etiology and antimicrobial susceptibility of udder pathogens from cases of subclinical mastitis in dairy cows in Sweden**. Acta Veterinaria Scandinavica, v. 53, n. 1, p. 36, 2011. Disponível em: <<https://doi.org/10.1186/1751-0147-53-36>>. Acesso em: 3 fev. 2022.

PINTO, MS. et al. **Queijo Minas Artesanal da região do Serro: Avaliação de *Staphylococcus aureus* e suas enteroxinas**. Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes, v. 59, n. 336, p. 82 - 86, 2004.

PINTO, MS. **Legislação sobre qualidade do leite no Brasil**. Desafio de cumprimento dos índices de qualidade do leite impostos pela instrução normativa nº 62/2011. Rio de Janeiro: Superintendência Federal da Agricultura, 2012.

PINTO, MS; LEMPK, MW; CABRINI, CC; *et al.* **Características físico-químicas e microbiológicas do queijo artesanal produzido na microrregião de montes claros-MG**. Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes, v. 71, n. 1, p. 43–52, 2016. Disponível em: <<https://www.revistadoilct.com.br/rilct/article/view/514>>. Acesso em: 27 jan. 2022.

PIRES, MF; ANACLETO, S; MARTINS, LHB. **Caracterização físico-química e microbiológica do queijo artesanal Serrano**. 9º Simpósio de Integração Científica e Tecnológica do Sul Catarinense – SICT-Sul. Disponível em: <<https://eventoscientificos.ifsc.edu.br/index.php/sictsul/9-sict-sul/paper/viewPaper/3197>>.

PITT, JL; HOCKING, A.D. **Fungi and food spoilage**. Londres: Ed. Blackie Academic&Professional, 3 ed., 519p, 2009.

POLEGATO, EPS; RUDGE, AC. **Estudo das características físico-químicas e microbiológicas dos leites produzidos por mini-usinas da região de Marília - São Paulo/Brasil**. Hig. aliment, p. 56–63, 2003. Disponível em: <<https://pesquisa.bvsalud.org/portal/resource/pt/lil-353640>>. Acesso em: 27 jan. 2022.

PONTAROLO, GH. **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: 25 jul. 2021.

PRETTO, AN. **Queijo artesanal serrano em São Francisco de Paula: avaliação das condições de fabricação e do processo de maturação**. Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado Profissional em Ambiente e Sustentabilidade da Universidade Estadual do Rio Grande do Sul. 2018.

QUIGLEY, L; O’SULLIVAN, O; STANTON, C; *et al.* **The complex microbiota of raw milk**. FEMS microbiology reviews, v. 37, n. 5, p. 664–698, 2013.

QUINN, PJ; MARKEY, BK; CARTER, ME; DONNELLY, WJ; LEONARD, FC. **Microbiologia veterinária e doenças infecciosas**, Porto Alegre: Artemed, 2005.

RAHMAN, MT; UDDIN, MS; SULTANA, R; MOUE, A; SETU, M. **Polymerase Chain Reaction (PCR): A Short Review**. Anwer Khan Modern Medical College Journal, [S. l.], v. 4, n. 1, p. 30–36, 2013. DOI: 10.3329/akmmcj.v4i1.13682. Disponível em: <https://www.banglajol.info/index.php/AKMMCJ/article/view/13682>. Acesso em: 27 jan. 2022.

RAPACCI, M; VAN DENDER, AGF. **Qualidade da matéria-prima e cuidados nos processamentos de requeijão cremoso e queijos fundidos**. Revista Leite e Derivados, n. 37, v. 8, p. 18-26, 1997.

REAL, CGA; ALEGRO, LCA; TURATE, M; *et al.* **Avaliação da qualidade físico-química e microbiológica de leite UHT integral e determinação da proteólise durante armazenamento.** Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes, v. 68, n. 394, p. 5–10, 2013. Disponível em: <<https://www.revistadoilct.com.br/rilct/article/view/37>>. Acesso em: 27 jan. 2022.

RESENDE, MFS. **Queijo Minas artesanal da Serra da Canastra:** influência da altitude e do nível de cadastramento das queijarias nas características físico-químicas e microbiológicas. 2010. Disponível em: <<https://repositorio.ufmg.br/handle/1843/SSLA-87MJQY>>. Acesso em: 27 jan. 2022.

REUTER, JÁ; SPACEK, DV; SNYDER, MP. **High-Throughput Sequencing Technologies.** Molecular Cell, v. 58, n. 4, p. 586–597, 2015. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1097276515003408>>. Acesso em: 27 jan. 2022.

RIEMEIER, A; LEBZIEN, P; FLACHOWSKY, G. **Influence of the ruminal N-balance on rumen metabolism.** Journal of Animal and Feed Sciences, v. 13, n. Suppl. 1, p. 191–194, 2004. Disponível em: <<http://www.jafs.com.pl/Influence-of-the-ruminal-N-balance-on-rumen-metabolism,73774,0,2.html>>. Acesso em: 27 jan. 2022.

RIES, J; SANTOS, J; WAGNER, S. A; 2012. **Projeto de qualificação e certificação do queijo Serrano produzido nos Campos de Cima da Serra do Rio Grande do Sul** – relato parcial de experiência. Agroecologia e Desenvolvimento Rural Sustentável, Porto Alegre, v.5, n.1, p.10- 19.

RIO GRANDE DO SUL. **Decreto n.º 54.199 de 24 de agosto de 2018, que Regulamenta a Lei n.º 14.973, de 29 de dezembro de 2016, que dispõe sobre a produção e a comercialização do queijo artesanal serrano no Estado do Rio Grande do Sul.** Disponível em: <<https://www.legisweb.com.br/legislacao/?id=366545>>. Acesso em: 10 de março de 2021.

RIO GRANDE DO SUL. **Instrução Normativa n.º 07 de 9 de dezembro de 2014.** Aprova o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade do Queijo Serrano. Diário Oficial Estadual, Porto Alegre, 14 de dez. de 2014.

RIO GRANDE DO SUL. **Instrução Normativa SEAPDR n.º 03,** de 11 de fevereiro de 2021. Estabelece a documentação e o fluxo a ser observado pelas agroindústrias produtoras de Queijo Artesanal Serrano que tenham interesse em obter o Selo Arte. Disponível em: <<https://www.agricultura.rs.gov.br/upload/arquivos/202104/09204314-in-selo-arte-queijo-serrano.pdf>>. Acesso em: 10 de março de 2021.

RIO GRANDE DO SUL. **Lei 15.615 de 13 de maio de 2021.** Que dispõe sobre a produção e a comercialização de queijos artesanais de leite cru e dá outras providências. Disponível em: <<https://leisestaduais.com.br/rs/lei-ordinaria-n-15615-2021-rio-grande-do-sul-dispoe-sobre-a-producao-e-a-comercializacao-de-queijos-artesanais-de-leite-cru-e-da-outras-providencias>>.

ROBINSON, RK. **Microbiologia lactológica:** microbiologia de los produtos lácteos. Zaragoza: Acribia, 1987.

ROCHA, AMP. **Controle de fungos durante a maturação de queijo minas padrão. 2004.** Disponível em: <<http://repositorio.ufsm.br/handle/1/5637>>. Acesso em: 27 jan. 2022.

ROCHA, AMP. **Controle de fungos durante a maturação de Queijo Minas Padrão. 2004.** 83 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2004.

RODRÍGUEZ-LÁZARO, D; LOMBARD, B; SMITH, H; *et al.* **Trends in analytical methodology in food safety and quality: monitoring microorganisms and genetically modified organisms.** Trends in food science & technology, 2007. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.tifs.2007.01.009>>. Acesso em: 27 jan. 2022.

RODRÍGUEZ-LÓPEZ, P; BERNÁRDEZ, M; RODRÍGUEZ-HERRERA, JJ; *et al.* **Identification and metagenetic characterisation of *Listeria monocytogenes*-harbouring communities present in food-related industrial environments.** Food Control, v. 95, p. 6–17, 2019. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0956713518303608>>. Acesso em: 27 jan. 2022.

ROSA, LS; QUEIROZ, MI. **Avaliação da qualidade do leite cru e resfriado mediante a aplicação de princípios do APPCC.** Food Science and Technology, v. 27, p. 422–430, 2007. Disponível em: <<http://www.scielo.br/j/cta/a/LmftHLBQRwzw6BMRsbWYgbP/abstract/?lang=pt>>. Acesso em: 27 jan. 2022.

ROSELINE, TI; SACHINDRA, NM. **Characterization of extracellular agarase production by *Acinetobacter junii* PS12B, isolated from marine sediments.** Biocatalysis and Agricultural Biotechnology, v. 6, p. 219–226, 2016. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1878818116300743>>. Acesso em: 3 fev. 2022.

ROSS, MG; RUSS, C; COSTELLO, M; *et al.* **Characterizing and measuring bias in sequence data.** Genome Biology, v. 14, n. 5, p. R51, 2013.

RUTHS, JÁ; MACEDO, LM; NASCIMENTO, MMF. **Reação de polimerase (PCR) em cadeia. Gestão da inovação agroindustrial diagnóstico molecular.** p 11. Editora da Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Curitiba, 2017.

SADOWY, E; LUCZKIEWICZ, A. **Drug-resistant and hospital-associated *Enterococcus faecium* from wastewater, riverine estuary and anthropogenically impacted marine catchment basin.** BMC microbiology, v. 14, p. 66, 2014.

SAEKI, EK; MATSUMOTO, LS. **Contagem de mesófilos e psicrotróficos em amostras de leite pasteurizado e UHT.** Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes, v. 65, n. 377, p. 29–35, 2010. Disponível em: <<https://www.revistadoilct.com.br/rilct/article/view/147>>. Acesso em: 27 jan. 2022.

SAILLANT, V; LIPUMA, D; OSTYN, E; *et al.* **A Novel *Enterococcus faecalis* Heme Transport Regulator (FhtR) Senses Host Heme To Control Its Intracellular Homeostasis.** mBio, v. 12, n. 1, p. e03392-20, 2021.

SALES, GA. **Caracterização microbiológica e físico-química de queijo minas artesanal da microrregião de Araxá - MG durante a maturação em diferentes épocas do ano.** 2015, 107f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) - Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2015.

SANGER, F; NICKLEN, S; COULSON, AR. **DNA sequencing with chain-terminating inhibitors.** Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 74 (1977) 5463–5467.

SANTA CATARINA. Lei n.º 17.003, de 1.º DE SETEMBRO DE 2016. **Dispõe sobre a produção e a comercialização do queijo artesanal serrano, no Estado de Santa Catarina.** Disponível em: < http://leis.aleg.br/html/2016/17003_2016_Lei.html>.

SANTIAGO-LÓPEZ, L; AGUILAR-TOALÁ, JE; HERNÁNDEZ-MENDOZA, A; *et al.* **Invited review: Bioactive compounds produced during cheese ripening and health effects associated with aged cheese consumption.** Journal of Dairy Science, v. 101, n. 5, p. 3742–3757, 2018. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0022030218301462>>. Acesso em: 27 jan. 2022.

SANTOS, LF; KOBLITZ, MGB. Proteases. In: KOBLITZ, M.G.B. **Bioquímica de Alimentos: Teoria e Aplicações Práticas.** Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008. Cap.3, p.77-106.

SANTOS, MJS; MEDEIROS, AKS; MELO, DS; BALIEIRO, AL; DE SA, JPN. **Caracterização de leite cru refrigerado produzido no interior de Sergipe frente aos parâmetros legislatórios no Brasil.** doi: <https://doi.org/10.31692/IICIAGRO.0301>. COINTER. Congresso Internacional da Agroindústria.

SCHMIDT, P; BÁLINT, M; GRESHAKE, B; *et al.* **Illumina metabarcoding of a soil fungal community.** 2013.

SCHREINER, DA; RUEGG, PL. **Effects of Tail Docking on Milk Quality and Cow Cleanliness1.** Journal of Dairy Science, v. 85, n. 10, p. 2503–2511, 2002. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0022030202743336>>. Acesso em: 28 jan. 2022.

SCOTT, R. **Fabricación de queso.** 2 edição, Zaragoza- Espanha, 2002.

SEIBOLD, E.; MAIER, T.; KOSTRZEWA, M.; ZEMAN, E.; SPLETTSTOESSER, W. **Identification of francisella tularensis by whole-cell matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry: fast, reliable, robust, and cost-effective differentiation on species and subspecies levels.** Journal of Clinical Microbiology, v. 48, p. 1061-1069, 2010.

SILVA, AL. **Avaliação da qualidade físico-química de diferentes marcas de leite ultra high temperature (UHT).** Trabalho de Curso apresentado ao Curso Superior de Tecnologia em Alimentos do Instituto Federal Goiano – Campus Morrinhos, para obtenção do título de Tecnólogo em Alimentos. 2020.

SILVA, BP; KRUMMENAUER, A; SCHUCH, LFD; *et al.* **Caracterização da produção e qualidade do leite em propriedades de agricultura familiar na região sul do Rio Grande do Sul.** Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes, v. 74, n. 4, p. 231–239, 2019. Disponível em: <<https://www.revistadoilct.com.br/rilct/article/view/745>>. Acesso em: 27 jan. 2022.

SILVA, BP; KRUMMENAUER, A; SCHUCH, LFD; *et al.* **Caracterização da produção e qualidade do leite em propriedades de agricultura familiar na região sul do Rio Grande do Sul.** Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes, v. 74, n. 4, p. 231–239, 2019. Disponível em: <<https://www.revistadoilct.com.br/rilct/article/view/745>>. Acesso em: 3 fev. 2022.

SILVA, F; SILVA, G; TONIAL, IB; *et al.* **Qualidade microbiológica e físico-química de queijos coloniais com e sem inspeção, comercializados no sudoeste do Paraná.** Boletim do Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos, v. 33, n. 2, 2016. Disponível em: <<https://revistas.ufpr.br/alimentos/article/view/47167>>. Acesso em: 27 jan. 2022.

SILVA, GWN; OLIVEIRA, MP; LEITE, KD. **Avaliação físico-química de leite in natura comercializado informalmente no sertão paraibano.** Doi: <http://dx.doi.org/10.18265/1517-03062015v1n35p34-41> Disponível em: <<https://periodicos.ifpb.edu.br/index.php/principia/article/view/720>>.

SILVA, JG. **Identificação molecular de bactérias ácido-láticas e propriedades probióticas in vitro de Lactobacillus spp. isolados de queijo Minas artesanal de Araxá, Minas Gerais.** 2016. Disponível em: <<https://repositorio.ufmg.br/handle/1843/SMOC-A77FYH>>. Acesso em: 27 jan. 2022.

SILVA, MAP; SANTOS, PA; ISEPON, JS; *et al.* **Influência do transporte a granel na qualidade do leite cru refrigerado.** 2009. Disponível em: <<http://repositorio.bc.ufg.br/handle/ri/12379>>. Acesso em: 27 jan. 2022.

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

SINDILEITE. **Boas Práticas Agropecuárias.** Cir Gráfica e Editora Ltda 3ª edição. 2020.

SMYTH, RP; SCHLUB, TE; GRIMM, A; *et al.* **Reducing chimera formation during PCR amplification to ensure accurate genotyping.** Gene, v. 469, n. 1–2, p. 45–51, 2010.

SORIANO, JM; FONT, G; MOLTÓ, JC; *et al.* **Enterotoxigenic staphylococci and their toxins in restaurant foods.** Trends in Food Science & Technology, v. 13, n. 2, p. 60–67, 2002. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0924224402000304>>. Acesso em: 27 jan. 2022.

SOUSA, AZB; *et al.* **Aspectos físico-químicos e microbiológicos do queijo tipo coalho comercializado em estados do nordeste do Brasil.** Arquivos do Instituto Biológico, v.81, n.1, p.30-35, 2014.

SOUZA, CFV; DALLA ROSA, T; AYUB, MAZ. **Changes in the microbiological and physicochemical characteristics of Serrano cheese during manufacture and ripening.**

Brazilian Journal of Microbiology, v. 34, p. 260–266, 2003. Disponível em: <<http://www.scielo.br/j/bjm/a/JGYLhx4mvp8HpPzFryBxK7p/?lang=en>>. Acesso em: 27 jan. 2022.

SOUZA, PV; GRECELLÉ, CBZ; BARRETO, F; *et al.* **Bacteria and yeasts associated to Colonial cheese production chain and assessment of their hydrolytic potential.** Brazilian Journal of Food Technology, v. 24, 2021. Disponível em: <<http://www.scielo.br/j/bjft/a/5wB6hbJKyqJmzSZnJ6mG8gh/?lang=en>>. Acesso em: 27 jan. 2022.

SOUZA, TP; EVANGELISTA, SR; PASSAMANI, FRF; *et al.* **Mycobiota of Minas artisanal cheese: Safety and quality.** International Dairy Journal, v. 120, p. 105085-, 2021. Disponível em: <<https://pubag.nal.usda.gov/catalog/7345825>>.

SREDNIK, ME; ARCHAMBAULT, M; JACQUES, M; *et al.* **Detection of a mecC-positive *Staphylococcus saprophyticus* from bovine mastitis in Argentina.** Journal of Global Antimicrobial Resistance, v. 10, p. 261–263, 2017. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2213716517301030>>. Acesso em: 28 jan. 2022.

STATSOFT, Inc. (2004). **STATISTICA** (data analysis software system), version 7. Disponível em: <http://www.statsoft.com>. Acesso em: 10 de março de 2021.

TANIWAKI, MH; VAN DENDER, AGF. **Bolores produtores de toxinas em queijos: ocorrência e significado.** Coletânea ITAL. Campinas, v.21, n.2, p.187-200, jul. 1991.

TAVARES, AB; CAVALCANTI, EANLD; TIMM, CD; *et al.* **Queijo artesanal produzido no sul do rio grande do sul: avaliação físico-química, microbiológica e suscetibilidade a antimicrobianos de isolados de *Staphylococcus coagulase* positiva.** Ciência Animal Brasileira, v. 20, 2019. Disponível em: <<http://www.scielo.br/j/cab/a/qDtnGWYNdnFvq96Vbh394DS/?lang=pt>>. Acesso em: 27 jan. 2022.

TEIXEIRA, RD. **O queijo artesanal serrano em São Francisco de Paula (RS): das especificidades da produção local aos limites da comercialização.** 2011. Disponível em: <<https://lume.ufrgs.br/handle/10183/54663>>. Acesso em: 27 jan. 2022.

TONET, RM; BANKUTI, FI; DAMASCENO, JC. **Interferência dos padrões de qualidade (CCS e CBT) no processamento de leite fluido e derivados.** 2020. Disponível em: <<https://www.milkpoint.com.br/artigos/industria-de-laticinios/a-vulnerabilidade-dos-padroes-de-qualidade-do-leite-e-a-relacao-entre-a-industria-e-os-produtores-218435/>>. Acesso em 02 abr. 2021.

TORNADIJO, E; FRESNO, JM; CARBALLO, J; *et al.* **Study of Enterobacteriaceae throughout the manufacturing and ripening of hard goats' cheese.** The Journal of Applied Bacteriology, v. 75, n. 3, p. 240–246, 1993.

TRONCO VM. **Manual para inspeção da qualidade do Leite.** 2 ed. Santa Maria, UFSM; 2003.

TRONCO, V. M. **Manual para Inspeção da Qualidade do Leite**. 3. ed. Santa Maria: Editora UFSM, 2008; 206p.

VAN HOORDE, K; HEYNDRICKX, M; VANDAMME, P; *et al.* **Influence of pasteurization, brining conditions and production environment on the microbiota of artisan Gouda-type cheeses**. *Food Microbiology*, v. 27, n. 3, p. 425–433, 2010.

VARNAM, AH; SUTHERLAND, J.P. **Leche y productos lácteos, tecnología, química y microbiología**. Zaragoza: Acribia, 1995.

VILAR, MJ; RODRÍGUEZ-OTERO, JL; SANJUÁN, ML; *et al.* **Implementation of HACCP to control the influence of milking equipment and cooling tank on the milk quality**. *Trends in Food Science & Technology*, v. 23, n. 1, p. 4–12, 2012. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0924224411001531>>. Acesso em: 27 jan. 2022.

VILLARRUEL-LOPEZ, A; CASTRO-ROSAS, J; OMEZ-ALDAPA, C. A; NUÑO, K; TORRES-VITELA, MR; MARTINEZ-GONZALES, NE; GARAY-MARTINEZ, LE. **Indicator microorganisms, Salmonella, Listeria monocytogenes, Staphylococcal enterotoxin, and physicochemical parameters in requeson cheese**. *African Journal of Food Science*, 10(9), 178-184, 2016.

VON NEUBECK, M; BAUR, C; KREWINKEL, M; *et al.* **Biodiversity of refrigerated raw milk microbiota and their enzymatic spoilage potential**. *International Journal of Food Microbiology*, v. 211, p. 57–65, 2015.

WANG, Y; QIAN, PY. **Conservative Fragments in Bacterial 16S rRNA Genes and Primer Design for 16S Ribosomal DNA Amplicons in Metagenomic Studies**. *PLoS ONE* 4 (10): e7401. 2009. Doi: <<https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.000740>>.

WESTBROOK, GL; O'HARA, Caroline Mohr; ROMAN, Susan B.; *et al.* **Incidence and Identification of Klebsiella planticola in Clinical Isolates with Emphasis on Newborns**. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 38, n. 4, p. 1495–1497, 2000. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC86473/>>. Acesso em: 27 jan. 2022.

WHITE, DG; HARMON, RJ; MATOS, JE; *et al.* **Isolation and identification of coagulase-negative Staphylococcus species from bovine body sites and streak canals of nulliparous heifers**. *Journal of Dairy Science*, v. 72, n. 7, p. 1886–1892, 1989.

WOESE, CR. 1987. **Bacterial evolution**. *Microbiol. Rev.* 51:221–271.

WOESE, CR; FOX, GE. **Phylogenetic Structure of the Prokaryotic Domain: The Primary Kingdoms**. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, Vol. 74, No. 11 (Nov., 1977), pp. 5088-5090.

WOESE, CR; Olsen, GJ; Ibba, M; Soll, D. 2000. **Comparisons of complete genome sequences allow the most objective and comprehensive descriptions possible of a lineage's evolution**. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 64:202–236.

YOON, Y; LEE, S; CHOI, K-H. Microbial benefits and risks of raw milk cheese. **Food Control**, v. 63, p. 201–215, 2016. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0956713515302863>>. Acesso em: 27 jan. 2022.

ZAGORSKA, J; CIPROVICA, I. **Evaluation of factors affecting freezing point of milk**. Int. J. Biol. Biomol. Agric. Food Biotechn. Engin., v.7, n.2, 2013.

ZDANOWICZ, M; SHELFORD, JA; TUCKER, CB; *et al.* **Bacterial populations on teat ends of dairy cows housed in free stalls and bedded with either sand or sawdust**. Journal of Dairy Science, v. 87, n. 6, p. 1694–1701, 2004.

ZEHNER, MM; FARNSWORTH, RJ; APPLEMAN, RD; *et al.* **Growth of environmental mastitis pathogens in various bedding materials**. Journal of Dairy Science, v. 69, n. 7, p. 1932–1941, 1986.

ZHANG, H; YOU, C. (2018). **A universal PCR method and its application in sequence-based identification of microorganisms in dairy**. International Dairy Journal, 85, 41–48.doi:10.1016/j.idairyj.2018.05.004.

ANEXO A - Avaliação da conformidade de propriedades produtoras de QAS quanto às suas condições de higiene em atendimento ao artigo n.º 12 (RS, 2018).

PARÂMETRO ANALISADO		C	NC	NA
Artigo 12 – Condições de higiene na produção do QAS				
I	O local de ordenha é coberto, possui piso revestido de material que permita a fácil limpeza e dispõe de água corrente em quantidade suficiente para permitir a sua correta higienização?			
II	As pessoas responsáveis pela ordenha possuem o curso de Boas Práticas Agropecuárias (BPA), sobre produção higiênica do leite, com participação comprovada por meio de certificado contendo a carga horária, o conteúdo programático, a identificação do instrutor com o registro no conselho profissional e a assinatura?			
III	As pessoas responsáveis pela fabricação de queijo estão capacitadas por meio de cursos de Boas Práticas de Fabricação (BPF), bem como a participação comprovada mediante certificado contendo a carga horária, o conteúdo programático, a identificação do instrutor com o registro no conselho profissional e a assinatura?			
IV	Há a elaboração e observância dos Procedimentos Operacionais Padronizados (POP's), e Manuais de Boas Práticas de Fabricação (MBPF) e de BPA, tendo mecanismos e ferramentas auditáveis de autocontrole em todas as etapas de obtenção da matéria-prima e da fabricação dos queijos?			
V	Há a realização periódica de das análises de leite cru do rebanho em laboratório RBQL, para monitoramento da CPP, CCS e de resíduos químicos e de sua análise físico-química?			
VI	Há a análise semestral de uma amostra de QAS para a avaliação do seu enquadramento no padrão microbiológico estabelecido para os queijos de média umidade, conforme exigido pela legislação específica e anualmente à avaliação da análise físico-química, podendo ser mais frequente a critério do serviço de inspeção?			
VII	As pessoas envolvidas na fabricação do QAS possuem carteira de saúde ou atestado de saúde renovados anualmente e são submetidos a exames de saúde, quando determinado pelo serviço de inspeção			
VIII	A água utilizada em todas as etapas da fabricação é comprovadamente potável, de acordo com os padrões estabelecidos? Ela é submetida semestralmente à análise microbiológica e anualmente à análise físico-química?			
XIV	Os reservatórios de água deverão são higienizados em frequência estabelecida pelo serviço de inspeção?			
X	As pessoas envolvidas na fabricação de queijo possuem vestuário exclusivo para esse fim, composto por calça comprida, botas, jalecos (ou similar) e gorro ou touca?			
XI	Na queijaria é vedado o ingresso de pessoas estranhas ao serviço no interior das queijarias, salvo nos casos autorizados pelo serviço de inspeção?			
Legenda: C = conforme NC = não conforme NA = não se aplica dada as características da propriedade				

Fonte: Adaptado (RS, 2018).

ANEXO B - Avaliação da conformidade de propriedades produtoras de queijo artesanal de leite cru quanto a Lei Estadual do RS n.º 15.615 de 13/05/2021.

Parâmetro analisado		C	NC	NA
CAPÍTULO II - Produção do queijo artesanal de leite cru				
Seção I - Dos Requisitos à Produção				
1	Estabelecimento rural certificado como livre de tuberculose e brucelose, ou controlado para brucelose e tuberculose por órgão estadual de defesa sanitária animal			
2	Controle de mastite com a realização de exames para detecção de mastite clínica e subclínica, incluindo análise do leite na propriedade em laboratório da RBQL – CCS e CBT – trimestralmente			
3	Implantação de Boas práticas de ordenha e de fabricação			
4	Controle de potabilidade da água utilizada nas atividades			
5	Para cada tipo de queijo possui RTIQ ou POP			
6	Período de maturação dos queijos artesanais, definido mediante comprovações laboratoriais de atendimento aos parâmetros microbiológicos existentes			
7	Maturação do queijo artesanal em outro estabelecimento, desde que cumpridas as exigências legais e sanitárias cabíveis			
Seção II - Dos Insumos				
Subseção I - Da Água				
8	Água utilizada na queijaria e na ordenha é potável, canalizada e em volume compatível com a demanda do processamento e das dependências sanitárias			
9	Água é filtrada antes de sua chegada ao reservatório			
10	Água utilizada canalizada desde a fonte até os reservatórios protegidos de qualquer tipo de contaminação			
11	Reservatórios de água higienizados, no mínimo, semestralmente			
12	Água utilizada na produção do queijo artesanal, submetida à análise microbiológica semestralmente, e físico-química anualmente, de acordo com os parâmetros vigentes			
13	Água clorada, especialmente quando constatada contaminação microbiológica, e o controle do teor de cloro deve ser realizado diariamente antes da queijaria entrar em atividade			
14	Permitida a utilização de água sem a realização da cloração, desde que se comprove, por análises microbiológicas consecutivas e bimestrais, que a água é livre de contaminação em um período de 6 (seis) meses			
Subseção II - Do Leite				
15	A propriedade rural que fornece o leite ou na qual está situada a queijaria deve dispor de curral de espera e ala de ordenha obedecendo a preceitos mínimos de construção, higiene e bem-estar animal			
	A sala de ordenha deve dispor de:			
I	Sistema de aquecimento de água quando utilizar tubulações para transferência de leite para adequada higienização dessas tubulações			
II	Pontos de água em quantidade suficiente para a manutenção das condições de higiene, durante e após a ordenha			
III	Piso impermeável, revestido de cimento áspero ou outro material apropriado, com declive suficiente de modo a permitir fácil escoamento das águas e de resíduos orgânicos			
IV	Pé-direito adequado à execução dos trabalhos e cobertura de material apropriado que permita a proteção adequada das operações			
16	O leite é produzido em condições higiênicas abrangendo o manejo do rebanho e os procedimentos de ordenha e transporte do leite até a queijaria			
17	Na utilização de leite fresco, a produção do queijo é iniciada em até 120 (cento e vinte) minutos após o início da ordenha			
18	Na utilização do leite refrigerado, o leite atinge uma temperatura inferior a 7 °C (sete graus Celsius) em um período de até 3 (três) horas após o início da ordenha			
19	O leite refrigerado utilizado para a fabricação do queijo artesanal é armazenado em equipamento adequado constituído de material atóxico por um período máximo de 14 (quatorze) horas após a ordenha, sendo permitido o acondicionamento do leite em vasilhames de material atóxico e seu armazenamento em geladeiras quando se tratar de pequenos volumes			
20	Todo leite é submetido à filtração antes de qualquer operação (refrigeração ou processamento)			

21	Se o leite é proveniente de propriedades fornecedoras, o transporte deste é em tarros, respeitando o período máximo de processamento do leite pela queijaria, respeitando a legislação pertinente para transporte de leite cru
22	Não é ministrado substâncias estimulantes de qualquer natureza capazes de provocar aumento de secreção láctea
23	Uso do leite proveniente de fêmeas que estejam no último mês de gestação ou na fase colostrada ou que estejam sendo submetidas a tratamento com produtos de uso veterinário, atentando-se também para o período de carência recomendado pelo fabricante

Seção III - Das Queijarias

24	A queijaria dispõe de ambientes adequados para recepção do leite, higienização de mãos e calçados (barreira sanitária), fabricação e processamento, maturação (quando aplicável), embalagem, estocagem (quando necessário), expedição e almoxarifado
25	A queijaria dispõe de vestiário/sanitário
26	A queijaria deve dispor de laboratório, quando adquirir leite de propriedade vizinha, equipado para a realização das análises básicas de recepção do leite, tais como temperatura, alizarol, acidez titulável, pesquisa de antibióticos, crioscopia e eventuais pesquisas de fraudes que se fizerem necessárias
27	A queijaria dispensa laboratório se processa leite exclusivamente de sua propriedade

28. Das instalações da queijaria

I	Possui local adequado e coberto para a transferência do leite para o interior da queijaria
II	A barreira sanitária deve possuir cobertura, lavador de botas, pias com torneiras com fechamento sem contato manual, sabão líquido inodoro e neutro, toalhas descartáveis de papel não reciclado ou dispositivo automático de secagem de mãos ou álcool gel e cestas coletoras de papel com tampa acionadas sem contato manual
III	Quando a queijaria possuir a partir de 10 (dez) funcionários, incluindo familiares e contratados, deverá possuir vestiários/sanitários separados por sexo
IV	O vestiário/sanitário é mantido limpo e provido de vaso sanitário com tampa, papel higiênico, pia, sabão líquido inodoro e neutro, cestas coletoras de papéis com tampa com fácil abertura, evitando o contato manual
V	O vestiário/sanitário deve ser equipado com dispositivos para guarda individual de pertences que permitam separação da roupa comum dos uniformes a serem utilizados na queijaria
VI	Vestiário/sanitário se instalado junto à queijaria, desde que não exista acesso direto das instalações com estes locais
VIII	Permitido o uso de sanitário já existente na propriedade quando se tratar de mão de obra exclusivamente familiar e este está localizado em uma distância inferior a 40 (quarenta) metros da queijaria
IX	Permitida a realização do processo de maturação do queijo em ambiente climatizado ou em temperatura ambiente
X	Queijarias com volumes de produção inferior a 100 (cem) litros de leite por dia e que realizem a maturação em temperatura ambiente fica permitida a realização do processo de maturação, fracionamento e embalagem no mesmo ambiente de produção, ficando também dispensadas de possuírem ambientes para estocagem e almoxarifado, desde que obedeçam ao fluxo de produção que não propicie contaminação cruzada e que possuam locais adequados para o armazenamento de insumos diários
29	A queijaria está protegida de fontes produtoras de mau cheiro, que possam comprometer a qualidade e a inocuidade do queijo, com impedimento, por meio de cerca, do acesso de animais, quando necessário
30	A queijaria pode ser instalada junto ao local de ordenha, desde que não exista comunicação direta entre eles
31	A pavimentação das áreas destinadas à circulação de veículos transportadores é de material que evite formação de poeira e empoçamentos
32	As áreas de circulação de pessoas e expedição possuem cobertura, e o material utilizado para pavimentação permite lavagem e higienização
33	Observando-se os riscos sanitários, a queijaria, especificamente de pequenos volumes, pode ser contígua à residência, desde que o acesso ao local de produção seja restrito aos responsáveis pela produção do queijo artesanal
34	Área útil construída compatível com a capacidade, processo de produção e tipo de equipamentos

35	Dependências construídas de maneira a oferecer um fluxograma operacional racionalizado em relação à recepção da matéria-prima, produção, embalagem, acondicionamento, armazenagem e expedição, além de atender aos seguintes requisitos:
I	Pé-direito com altura suficiente permitindo boas condições de ventilação, sendo permitida a utilização de ambientes climatizados
II	Iluminação abundante, natural ou artificial, em todas as dependências da queijaria
III	Instalações elétricas embutidas ou externas e, neste caso, revestidas por tubulações isolantes e fixadas a paredes e tetos
IV	Pisos, paredes, forros ou lajes, portas, janelas, equipamentos e utensílios constituídos de material resistente e de fácil limpeza
V	Declividade de piso suficiente para escoamento de águas residuais em direção aos ralos sifonados ou canaletas
VI	Paredes da área de processamento revestidas com material lavável de cores claras para a realização das operações, sendo permitidas cores escuras no ambiente de maturação
VII	Todas as aberturas para a área externa dotadas de telas milimetradas à prova de insetos
VIII	Local específico e identificado para a guarda de produtos de limpeza, embalagem e ingredientes que não permita contaminação de nenhuma natureza
IX	Pontos de água em número suficiente para a produção e manutenção das condições de higiene
X	Tubulação de material atóxico, de fácil higienização e não oxidável, para a entrada do leite e saída do soro da queijaria, permanecendo vedada quando em desuso
XI	Recepção do leite e expedição providas de projeção de cobertura para a proteção das operações
XII	Os produtos que necessitam de refrigeração armazenados com afastamento que permita circulação de frio
XIII	Utilização de utensílios de madeira durante o processo de fabricação e maturação, desde que estejam em boas condições de uso e permitam limpeza adequada
36	Como elemento arquitetônico, utilização de "container" na construção da queijaria, desde que não comprometa os requisitos sanitários estabelecidos no art. 11 desta Lei
37	Observando-se os riscos sanitários e o volume de produção, fica permitido o uso de equipamentos simples, considerando-se:
I	A multifuncionalidade dos ambientes, respeitando as particularidades de cada processo e, quando necessário, o estabelecimento de horários alternados das diferentes operações
II	As instalações de frio supridas por balcão de resfriamento, refrigerador, congelador, ar-condicionado ou outro mecanismo de frio adequado
III	O equipamento lava-botas substituído por um local de armazenagem de calçado limpo para a entrada da queijaria, devendo sua higienização ser realizada antes de seu armazenamento no local
IV	Quando necessário o aquecimento no processo produtivo, poderá é utilizado fogareiro a gás ou qualquer outra fonte de calor que não ocasione risco sanitário na fabricação do queijo
Seção IV - Dos Manipuladores	
38	Todos os manipuladores envolvidos direta ou indiretamente no processo de produção possuem treinamento em boas práticas de ordenha e/ou fabricação, ficando obrigados a cumprir práticas de higiene pessoal e operacional que preservem a inocuidade do produto
39	Os manipuladores fazem exames de saúde anualmente ou sempre que se fizer necessário
40	Obrigatório o uso de uniformes, gorros, calçados próprios e limpos para os manipuladores do queijo
41	A propriedade rurais próximas, fornecedoras de leite às queijarias, atendem ao disposto neste tópico referente a manipuladores
CAPÍTULO III - DA COMERCIALIZAÇÃO	
Seção I - Da Embalagem	
42	O queijo artesanal pode ser comercializado com ou sem embalagem, conforme a característica do produto, permitindo sua rastreabilidade: a) com embalagem b) sem embalagem
43	Quando o queijo artesanal utilizar embalagem, esta deverá ser de material aprovado para uso em alimentos, com a finalidade de protegê-lo de agentes externos, de alterações e de contaminações, assim como adulterações, contendo as informações obrigatórias para o consumidor

44	Quando o queijo artesanal não utilizar embalagem, deverá ser comercializado em estabelecimentos que promovam a estocagem adequada do produto protegendo-o de possíveis contaminações externas
45	No queijo artesanal comercializado sem embalagem, há a identificação na peça, com marcação de relevo ou com a utilização de material atóxico, das informações mínimas: denominação de venda, estabelecimento produtor e data de fabricação
46	Produtor deve disponibilizar, nos postos de venda ou junto ao queijo, material informativo com as demais informações obrigatórias para o consumidor
Seção II - Do Transporte	
47	O transporte é compatível com a natureza dos produtos, de modo a preservar sempre suas condições tecnológicas, higiênicas e de qualidade, de forma organizada, evitando condições que possam comprometer o produto
48	O veículo utilizado para transporte dispõe de carroceria fechada e atender a boas condições de higiene.
49	Os queijos são acondicionados de forma a evitar sua contaminação ou deformação
50	Em pequena produção e comercialização, é permitida a utilização de caixas isotérmicas higienizáveis, sendo que os produtos que necessitem de refrigeração deverão ser transportados nas isotérmicas juntamente com gelo reciclável e higienizável
51	Os veículos de carroceria isotérmica possuem revestimento interno de material não oxidável, impermeável e de fácil higienização e, quando necessário, dotados de unidade de refrigeração
Seção III - Do Registro	
52	São atos autorizativos para a comercialização do queijo artesanal de leite cru o registro da queijaria e do queijo a ser comercializado junto ao Serviço de Inspeção Municipal, estadual ou Federal.a) SIM b) CISPOA C) SIF
53	O registro da queijaria é composto com os seguintes documentos
I	Requerimento, conforme modelo padrão
II	Cópia do Cadastro Nacional de Pessoa Jurídica - CNPJ - ou Cadastro de Pessoa Física - CPF - e da Inscrição Estadual - IE - ou Inscrição Estadual de Produtor Rural
III	Cópia do contrato social registrado na junta comercial, quando for pessoa jurídica
IV	Código da propriedade no Sistema de Defesa Agropecuária - SDA - onde estão os animais
V	Cópia do registro da propriedade e/ou do contrato de arrendamento ou equivalente
VI	Alvará de licença e funcionamento da prefeitura
VII	Exame negativo atualizado de brucelose e tuberculose de todos os animais
VIII	Licenciamento ambiental
IX	Laudo de análise microbiológica da água
X	Planta baixa, compreendendo localização da sala de ordenha e queijaria com equipamentos, pontos de água e rede de esgoto, que poderá ser elaborado por profissionais habilitados de órgãos governamentais ou privados
XI	Formulário simplificado e "layout" dos rótulos para registro dos queijos contendo as informações necessárias, conforme modelos-padrão, que poderá ser elaborado por profissionais habilitados de órgãos governamentais e privados
54	A queijaria manter disponível no estabelecimento manual de boas práticas de ordenha e fabricação composto por procedimentos básicos realizados na ordenha e queijaria, contendo registros mínimos necessários para a rastreabilidade do produto
55	Os manipuladores possuem certificado de conclusão de curso de boas práticas agropecuárias e/ou de fabricação
56	56. Emissão do certificado de conclusão do módulo deverá conter, no mínimo, a carga horária, o conteúdo programático, a identificação do responsável por ministrar o treinamento, sua assinatura e seu registro em conselho profissional
57	Os manipuladores possuem carteira de saúde ou atestado de saúde que devem ser renovados anualmente
58	A queijaria possui responsável técnico, que poderá ser suprido por profissionais técnicos de órgãos governamentais ou privados ou por técnicos de assistência técnica, exceto agentes de fiscalização sanitária
59	O responsável técnico de que trata o "caput" deve ser um médico veterinário, devidamente inscrito no Conselho Regional de Medicina Veterinária - CRMV
60	Existe termo de compromisso em andamento para ajuste da efetivação do registro da queijaria, a critério do órgão de controle sanitário competente. Data de assinatura e Prazo definido

Legenda:

C = conforme

NC = não conforme

NA = não se aplica dada as características da propriedade

Fonte: adaptado (RS, 2021).

ANEXO C - Taxonomia geral das bactérias identificadas no experimento com as suas respectivas abundâncias (*reads*) (reino-gênero), em diferentes temperaturas (5; 12,5 e 20 °C) ao longo de sua maturação.

Reino															
Reino	Temperatura de maturação 5 °C					Temperatura de maturação 12,5 °C					Temperatura de maturação 20 °C				
	D:0	D:15	D:30	D:45	D:60	D:0	D:15	D:30	D:45	D:60	D:0	D:15	D:30	D:45	D:60
Bactéria	45362	33351	45674	21885	20384	45362	19022	11441	26143	7038	45362	41614	22861	37812	6106
Filo															
Filo	Temperatura de maturação 5 °C					Temperatura de maturação 12,5 °C					Temperatura de maturação 20 °C				
	D:0	D:15	D:30	D:45	D:60	D:0	D:15	D:30	D:45	D:60	D:0	D:15	D:30	D:45	D:60
Firmicutes	40411	28471	38682	17481	17974	40411	9673	11429	26140	7037	40411	31501	22861	37812	6099
Proteobacteria	4951	4880	6992	4404	2410	4951	9349	12	3	1	4951	10113			7
Classe															
Classe	Temperatura de maturação 5 °C					Temperatura de maturação 12,5 °C					Temperatura de maturação 20 °C				
	D:0	D:15	D:30	D:45	D:60	D:0	D:15	D:30	D:45	D:60	D:0	D:15	D:30	D:45	D:60
Bacilli	40411	28471	38682	17481	17973	40411	28471	38682	17481	17973	40411	31501	22861	37812	6099
Clostridia					1					1					
Epsilonproteobacteria			1					1							7
Gammaproteobacteria	4951	4880	6991	4404	2410	4951	4880	6991	4404	2410	4951	10113			
Ordem															
Ordem	Temperatura de maturação 5 °C					Temperatura de maturação 12,5 °C					Temperatura de maturação 20 °C				
	D:0	D:15	D:30	D:45	D:60	D:0	D:15	D:30	D:45	D:60	D:0	D:15	D:30	D:45	D:60
Bacillales	904	596	3268	85	748	904	62	3001	404		904	4	31	3	
Campylobacteriales			1				1								7
Clostridiales					1		1			3					
Enterobacteriales	4778	4806	6991	4402	2410	4778	8816		3	1	4778	9914			
Lactobacillales	39507	27875	35414	17396	17225	39507	9610	8428	25736	7034	39507	31497	22830	37809	6099
Pseudomonadales	173	74		2		173	532	12			173	199			
Família															
Família	Temperatura de maturação 5 °C					Temperatura de maturação 12,5 °C					Temperatura de maturação 20 °C				
	D:0	D:15	D:30	D:45	D:60	D:0	D:15	D:30	D:45	D:60	D:0	D:15	D:30	D:45	D:60
Bacillaceae										2972					
Enterobacteriaceae	4771	4790	6990	4398	2409	4771	8796		3	1	4771	9842			
Enterococcaceae	20021	15398	4457	11229	2523	20021	5180	4120	25248	6614	20021	30998	22471	12905	2852

Erwiniaceae	7	16	1	4	1	7	20				7	72			
Helicobacteraceae			1				1								7
Lactobacillaceae			2		4		13	24	144	35		193	110	124	12
Leuconostocaceae	6	31	89	70	33	6	7	105	14	25	6	27	2	59	12
Moraxellaceae	160	15				160		12			160	16			
Pseudomonadaceae	13	59		2		13	532				13	183			
Ruminococcaceae					1		1			3					
Staphylococcaceae	904	596	3268	85	748	904	62	29	404		904	4	31	3	
Streptococcaceae	19480	12446	30866	6097	14665	19480	4410	4179	330	360	19480	279	247	24721	3223
Gênero															
Gênero	Temperatura de maturação 5 °C					Temperatura de maturação 12,5 °C					Temperatura de maturação 20 °C				
	D:0	D:15	D:30	D:45	D:60	D:0	D:15	D:30	D:45	D:60	D:0	D:15	D:30	D:45	D:60
Acinetobacter	27	15				27					27	12			
Averyella	4	15				4					4	0			
Bacillus								2972				0			
Citrobacter		505					51					162			
Cronobacter							69					0			
Enterobacter	1		1			1	13				1	31			
<i>Enterococcus</i>	20021	15398	4457	11229	2523	20021	5180	4120	25248	6614	20021	30998	22471	12905	2852
Escherichia		8										0			
Hafnia	363	485		31		363	113				363	3			
Klebsiella							124					0			
Kluyvera	1	184		74		1	262				1	692			
Lactobacillus			2		4		13	24	144	35		193	110	124	12
<i>Lactococcus</i>	19394	12446	30863	6096	14647	19394	4410	4179	328	360	19394	279	243	24721	3223
Lelliottia	5	1		1		5	3				5				
Leuconostoc	6	31	89	70	33	6	7	105	14	25	6	27	2	59	12
Moraxella	133					133		12			133	4			
Obesumbacterium	834	121		92		834	304		1		834	0			
Pantoea	7	16	1	4	1	7	20				7	72			
Pectobacterium	4	3	12		9	4					4	0			
Pseudomonas	13	59		2		13	532				13	183			
Rahnella	1	42	21	4	1	1	1				1	13			
Raoultella		2					377					80			

Ruminococcus					1		1			3		0	
Serratia	3147	1915	6956	116	2399	3147	6943		2		3147	0	
Staphylococcus	904	596	3268	85	748	904	62	29	404		904	4	31 3
Streptococcus	86		3	1	18	86			2		86		4
Sulfuricurvum			1				1						7
Tiedjeia	4	2				4	0				4		
Yersinia	185	18		19		185	51				185		
Não identificada	222	1489		4061		222	485			1	222	8861	

Fonte: Própria (2022).

ANEXO D - Classificação biológica das bactéria ácido lácticas nas amostras de QAS em diferentes temperaturas (5; 12,5 e 20 °C) ao longo de sua maturação.

Taxonomia bacteriana (patogênicas)							Temperatura de maturação 5 °C					Temperatura de maturação 12,5 °C					Temperatura de maturação 20 °C									
Reino	Filó	Classe	Ordem	Família	Gênero	Espécies	D:0	D:15	D:30	D:45	D:60	D:0	D:15	D:30	D:45	D:60	D:0	D:15	D:30	D:45	D:60					
Bactéria	Firmicutes		Bacilli	Lactobacillales	Enterococcaceae	<i>Enterococcus</i>	<i>Enterococcus casseliflavus</i>										3					81				
							<i>Enterococcus devriesei</i>	13	1				13	2	8	11	2	13	11			20	2			
							<i>Enterococcus durans</i>	15	1	11		21	15			2		15					8	1		
							<i>Enterococcus faecium</i>	3	1			1	3			2		3	2	3						
							<i>Enterococcus pseudoavium</i>		3	1		4		3		1				10						
							<i>Enterococcus sp.</i>	199	153	444	112	249	1999	5175	4112	2522	6612	199	309	224	128	2768	90	72	66	77
							<i>Enterococcus thailandicus</i>			5						5				2						
					Lactobacillaceae	Lactobacillus	<i>Lactobacillus amylovorus</i>							1					5							1
							<i>Lactobacillus brevis</i>									1						1	3			
							<i>Lactobacillus casei</i>			2		4		12	23	144	30		193	109	121	11				
					Streptococaceae	<i>Lactococcus</i>	<i>Lactococcus lactis</i>	38	21	58	10	26	38	12	11	1	1	38				51	7			
							<i>Lactococcus sp.</i>	193	124	308	608	146	1935	4398	4168	327	359	193	279	243	246	3216	56	25	05	6
					Leuconostocaceae	Leuconostoc	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	6	31	89	70	33	6	4	105	14	25	6	25	2	59	12				
							<i>Leuconostoc pseudomesenteroides</i>							3					2							
					Streptococaceae	Streptococcus	<i>Streptococcus dysgalactiae</i>	86		3	1	18	86				2		86		4					

Fonte: Própria (2022).

ANEXO E: Classificação biológica das bactéria patogênicas nas amostras de QAS em diferentes temperaturas (5; 12,5 e 20 °C) ao longo de sua maturação.

Taxonomia bacteriana (patogênicas)							Temperatura de maturação 5 °C					Temperatura de maturação 12,5 °C					Temperatura de maturação 20 °C											
Reino	Filó	Classe	Ordem	Família	Gênero	Espécies	D:0	D:15	D:30	D:45	D:60	D:0	D:15	D:30	D:45	D:60	D:0	D:15	D:30	D:45	D:60							
Bactéria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Enterobacteriales	Enterobacteriaceae	Averyella	<i>Averyella dalhousiensis</i>	4	15				4					4											
					Citrobacter	<i>Citrobacter braakii</i>		147					27								78							
						<i>Citrobacter freundii</i>		342					0															
						<i>Citrobacter sp.</i>		16					24									84						
					Cronobacter	<i>Cronobacter dublinensis</i>											41											
						<i>Cronobacter turicensis</i>											28											
					Enterobacter	<i>Enterobacter cancerogenus</i>											2					14						
						<i>Enterobacter cloacae</i>								1			11											
						<i>Enterobacter sp.</i>					1					1					1	17						
					Não identificado	<i>Enterobacteriaceae</i>					222	1489		4061		222	485			1	222	8861						
					Escherichia	<i>Escherichia vulneris</i>						8																
					Hafnia	<i>Hafnia alvei</i>					363	485		31		363	113				363	3						
					Klebsiella	<i>Klebsiella oxytoca</i>											124											
					Kluyvera	<i>Kluyvera ascorbata</i>						179		36			46					692						
						<i>Kluyvera cryocrescens</i>								30			151											
						<i>Kluyvera georgiana</i>								8			65											
<i>Kluyvera intermedia</i>						1	5				1					1												

		Lelliottia	<i>Lelliottia amnigena</i>	5	1	1	5	3		5			
		Obesumbacterium	<i>Obesumbacterium proteus</i>	834	121	92	834	304	1	834			
		Pectobacterium	<i>Pectobacterium carotovorum</i>	4	3	12	0	9	4	4			
		Rahnella	<i>Rahnella aquatilis</i>	1	42	21	4	1	1	1			
		Raoultella	<i>Raoultella ornithinolytica</i>							292			
			<i>Raoultella planticola</i>							13			
			<i>Raoultella terrigena</i>		2					72	80		
		Serratia	<i>Serratia liquefaciens</i>	184	105	387	77	136	184	1	1	184	
				<i>Serratia marcescens</i>	4	8	1		9	4		4	
				<i>Serratia proteamaculans</i>		12						682	
				<i>Serratia rubidaea</i>	130	845	308	39	103	130		1	130
				<i>Serratia ureilytica</i>	3		5		0	3			3
		Tiedjeia	<i>Tiedjeia arctica</i>						28			90	
		Yersinia	<i>Yersinia frederiksenii</i>	4	2				4			4	
			<i>Yersinia massiliensis</i>	161	17		19		161	51		161	
			<i>Yersinia massiliensis</i>	24	1				24			24	
	Erwiniaceae	Pantoea	<i>Pantoea agglomerans</i>	2	9	1	3		2	0		2	39
				<i>Pantoea ananatis</i>	5	7		1	1	5	20		5
Pseudomonadales	Moraxellaceae	Acinetobacter	<i>Acinetobacter guillouiae</i>	25	14				25			25	4
			<i>Acinetobacter johnsonii</i>	2	1				2				2
		Moraxella	<i>Moraxella osloensis</i>	133					133	12			133
			<i>Pseudomonas fragi</i>	13			0		13			13	15

Firmicutes			Pseudomonadaceae	Pseudomonas	<i>Pseudomonas putida</i> group	59		2		532			168					
	Epsilonproteobacteria	Campylobacteriales	Helicobacteraceae	Sulfuricum	<i>Sulfuricum kujiense</i>			1		1			7					
	Clostridia	Clostridiales	Ruminococcaceae	Ruminococcus	<i>Ruminococcus faecis</i>				1	1		3						
	Bacilli	Bacillales	Staphylococcaceae	Staphylococcus	<i>Staphylococcus agnetis</i>	5				5			5					
					<i>Staphylococcus aureus</i>	899	596	3268	85	748	899	62	24	404	899	4	31	3
					<i>Staphylococcus hominis</i>									5				
			Bacillaceae	Bacillus	<i>Bacillus cereus</i> group						297		2					

Fonte: Própria (2022).

ANEXO F - Taxonomia geral dos fungos identificados no experimento com as suas respectivas abundâncias (*reads*) (reino-gênero), em diferentes temperaturas (5; 12,5 e 20 °C) ao longo de sua maturação.

Reino															
Reino	Temperatura de maturação 5 °C					Temperatura de maturação 12,5 °C					Temperatura de maturação 20 °C				
	D:0	D:15	D:30	D:45	D:60	D:0	D:15	D:30	D:45	D:60	D:0	D:15	D:30	D:45	D:60
Fungi	6511	6067	26446	17116	36613	6511	8760	107546	17376	43415	6511	27779	34096	NI*	6578
Filo															
Filo	Temperatura de maturação 5 °C					Temperatura de maturação 12,5 °C					Temperatura de maturação 20 °C				
	D:0	D:15	D:30	D:45	D:60	D:0	D:15	D:30	D:45	D:60	D:0	D:15	D:30	D:45	D:60
Ascomycota	5934	1605	26333	16203	33711	5934	4931	107330	15827	8048	5934	27779	33308	NI	6445
Basidiomycota	577		113	913	2902	577		216	1549	35367	577		788	NI	133
Mucoromycota		4462					3829							NI	
Classe															
Classe	Temperatura de maturação 5 °C					Temperatura de maturação 12,5 °C					Temperatura de maturação 20 °C				
	D:0	D:15	D:30	D:45	D:60	D:0	D:15	D:30	D:45	D:60	D:0	D:15	D:30	D:45	D:60
Agaricomycetes	113		113	249	0	113					113	0	788	NI	
Dothideomycetes							717					15032		NI	
Eurotiomycetes								9439						NI	6421
Mucoromycetes		4462					3829							NI	
Saccharomycetes	5934	1605	26333	16203	33711	5934	4214	97891	15827	8048	5934	12747	33308	NI	
Sordariomycetes														NI	24
Tremellomycetes	464			664	2902	464		216	1549	35367	464			NI	133
Ordem															
Ordem	Temperatura de maturação 5 °C					Temperatura de maturação 12,5 °C					Temperatura de maturação 20 °C				
	D:0	D:15	D:30	D:45	D:60	D:0	D:15	D:30	D:45	D:60	D:0	D:15	D:30	D:45	D:60
Agaricales	113		113	249		113					113		788	NI	
Cladosporiales							717					15032		NI	
Eurotiales								9439						NI	6421
Filobasidiales				664										NI	
Hypocreales														NI	24
Mucorales		4462					3829							NI	
Saccharomycetales	5934	1605	26333	16203	33711	5934	4214	97891	15827	8048	5934	12747	33308	NI	
Trichosporonales	464				2902	464		216	1549	35367	464			NI	133

Família															
Família	Temperatura de maturação 5 °C					Temperatura de maturação 12,5 °C					Temperatura de maturação 20 °C				
	D:0	D:15	D:30	D:45	D:60	D:0	D:15	D:30	D:45	D:60	D:0	D:15	D:30	D:45	D:60
Aspergillaceae									9439					NI	6421
Cladosporiaceae							717					15032		NI	
Cordycipitaceae														NI	24
Debaryomycetaceae	5483	1605	26333	16203	33694	5483	1237	3292	7269	7822	5483	10780	33308	NI	
Dipodascaceae					17		2898	94599						NI	
Filobasidiaceae				664										NI	
Mucoraceae		4462					3829							NI	
Phaffomycetaceae							79							NI	
Pichiaceae												1967		NI	
Saccharomycetaceae	451					451			8558	226	451			NI	
Tricholomataceae	113		113	249	0	113			0	0	113		788	NI	
Trichosporonaceae	464				2902	464		216	1549	35367	464			NI	133
Gênero															
Gênero	Temperatura de maturação 5 °C					Temperatura de maturação 12,5 °C					Temperatura de maturação 20 °C				
	D:0	D:15	D:30	D:45	D:60	D:0	D:15	D:30	D:45	D:60	D:0	D:15	D:30	D:45	D:60
Akanthomyces														NI	24
Cladosporium							717					15032		NI	0
Cutaneotrichosporon	464				2902	464		216	1549	35367	464			NI	133
Galactomyces								56767						NI	
Geotrichum					17			29309						NI	
Kluyveromyces	451					451			8558	226	451			NI	
Kurtzmaniella	5483	1452	26333	15250	33694	5483	1237	3292	7269	7822	5483	10780	33308	NI	
Mucor		4462					3829							NI	
Naganishia				664										NI	
Penicillium								9439						NI	6421
Pichia												1967		NI	
Teunomyces		153		953										NI	
Tricholoma	113		113	249		113					113		788	NI	
Wickerhamomyces							79							NI	
Yarrowia							2898	8523						NI	

Fonte: Própria (2022). *NI: Não identificado.

ANEXO G - Classificação biológica fúngica nas amostras de QAS em diferentes temperaturas (5; 12,5 e 20 °C) ao longo de sua maturação.

Taxonomia bacteriana (patogênicas)							Temperatura de maturação 5 °C					Temperatura de maturação 12,5 °C					Temperatura de maturação 20 °C										
Reino	Filo	Classe	Ordem	Família	Gênero	Espécies	D:0	D:15	D:30	D:45	D:60	D:0	D:15	D:30	D:45	D:60	D:0	D:15	D:30	D:45	D:60						
Fungi	Ascomycota	Eurotiomycetes	Eurotiales	Aspergillaceae	Penicillium	<i>Penicillium camemberti</i>																9023					
						<i>Penicillium paneum</i>																					6421
		Dothideomycetes	Cladosporiales	Cladosporiaceae	Cladosporium	<i>Cladosporium cladosporioides</i>																		15032			
						<i>Galactomyces reessii</i>																					56767
		Saccharomycetes	Saccharomycetales	Dipodascaceae	Geotrichum	<i>Geotrichum candidum</i>							17												29309		
						<i>Yarrowia lipolytica</i>																					2898 8523
						<i>Kluyveromyces marxianus</i>	451									451				8558	226		451				
				Pichiaceae	Pichia	<i>Pichia kudriavzevii</i>																					1967
						<i>Wickerhamomyces anomalus</i>																					
				Debaryomycetaceae	Teunomyces	<i>[Candida] sake</i>																					153 953
						<i>[Candida] zeylanoides</i>	5483	1452	26333	15250	33694	5483	1237	3292	7269	7822	5483	10780	33308								
		Sordariomycetes	Hypocreales	Cordycipitaceae	Akanthomyces	<i>Akanthomyces lecanii</i>																			24		
		Basidiomycota	Agaricomycetes	Agaricales	Tricholomataceae	Tricholoma	<i>Tricholoma matsutake</i>	113			249				113										113 788		
							<i>Cutaneotrichosporon curvatum</i>	464																			
				Tremellomycetes	Filobasidiales	Filobasidiaceae	Naganishia	<i>Naganishia liquefaciens</i>																		664	
		Mucoromycota	Mucoromycetes	Mucorales	Mucoraceae	Mucor	<i>Mucor bainieri</i>																		1220		
							<i>Mucor circinelloides</i>																				

Fonte: Própria (2022).