

UNIVERSIDADE FEDERAL DOS VALES DO JEQUITINHONHA E MUCURI

Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos

Julia Silva Pinheiro

MATURAÇÃO DO QUEIJO MINAS ARTESANAL: Comportamento de *Listeria monocytogenes*, Aceitação Sensorial e Predição do Tempo por Espectroscopia no Infravermelho.

Diamantina

2018

Julia Silva Pinheiro

MATURAÇÃO DO QUEIJO MINAS ARTESANAL: Comportamento de *Listeria monocytogenes*, Aceitação Sensorial e Predição do Tempo por Espectroscopia no Infravermelho.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos da Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri, como requisito parcial para obtenção do título de mestre.

Orientador: Paulo de Souza Costa Sobrinho

Diamantina

2018

Elaborado com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

P654m

Pinheiro, Júlia Silva

Maturação do Queijo Minas Artesanal: comportamento de *Listeria monocytogenes*, aceitação sensorial e predição do tempo por espectroscopia no infravermelho / Júlia Silva Pinheiro. – Diamantina, 2018.

111 p. : il.

Orientador: Paulo de Souza Costa Sobrinho

Dissertação (Mestrado – Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri.

1. Inocuidade de alimentos. 2. Mapa de Preferência. 3. FTIR-ATR. 4. Queijo Artesanal do Serro. 5. *Listeria monocytogenes*. I. Costa Sobrinho, Paulo de Souza. IV. Título. V. Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri.

CDD 664

Ficha Catalográfica – Serviço de Bibliotecas/UFVJM
Bibliotecário Anderson César de Oliveira Silva, CRB6 – 2618.

JULIA SILVA PINHEIRO

Maturação do queijo minas artesanal: Comportamento de Listeria monocytogenes, aceitação sensorial e predição do tempo por espectroscopia no infravermelho

Dissertação apresentada ao
MESTRADO EM CIÊNCIA E
TECNOLOGIA DE ALIMENTOS, nível
de MESTRADO como parte dos
requisitos para obtenção do título de
MAGISTER SCIENTIAE EM CIÊNCIA
E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS

Orientador : Prof. Dr. Paulo De Souza
Costa Sobrinho

Data da aprovação : 13/06/2018



Prof.Dr. PAULO DE SOUZA COSTA SOBRINHO - UFVJM



Prof.Dr.ª CINTIA LACERDA RAMOS - UFVJM



Prof.Dr. CLEUBE ANDRADE BOARI - UFVJM

DIAMANTINA

Agradecimentos

Agradeço primeiramente a Deus por colocar pessoas incríveis ao meu lado!!

A minha mãe Marcia, ao meu pai Juvenal por sempre incentivar eu e meus irmãos no caminho da educação e por não medirem esforços para que eu pudesse concretizar este sonho.

Aos meus irmãos Ezequiel e Artur, pelo carinho, incentivo, e palavras de conforto nos momentos difíceis.

Ao meu marido Marcelo pelo companheirismo, paciência e ajuda indispensável.

Ao meu filho Miguel que esteve tão presente na concretização deste trabalho sempre me animando com sorrisos e abraços!

Ao professor Paulo, pelos conhecimentos repassados desde a graduação com a iniciação científica e pelo auxílio, incentivo, amizade na orientação do mestrado.

Aos colegas do mestrado especialmente a Bruna pela grande ajuda em todas as análises e pela companhia nos feriados e finais de semana no laboratório.

Ao Renato por todas as caronas para o Campus 2, inclusive domingo e feriados.

A Eliznara, Mariana, Mayara e Alexandre pela ajuda nas análises físico-químicas.

Aos produtores de queijo do Serro, pela receptividade e a Cooperativa de produtores rurais do Serro e em especial ao funcionário Edvaldo pela presteza e interesse em ajudar na pesquisa.

A CAPES pelo auxílio de bolsa, FAPEMIG pelo financiamento do projeto.

UFVJM e PPGCTA pela oportunidade!

O meu muito obrigado!

Resumo

O período de maturação corresponde à fase importante na produção de queijos, em decorrência de alterações em suas propriedades microbiológicas, físico-químicas e sensoriais. Diante disto, o processo de maturação do Queijo Minas Artesanal (QMA) do Serro foi objeto de pesquisa, considerando-se o comportamento de *Listeria monocytogenes* (*L.m*), a aceitação sensorial e predição do período de maturação através da espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier e refletância total atenuada (FTIR-ATR), assim como determinações físico-químicas de acidez, pH, umidade, resíduo mineral fixo, cloreto de sódio, proteínas, gordura e atividade de água. Para avaliar o comportamento de *L.m*, cinco cepas foram inoculadas (2×10^8 UFC/mL) aos queijos, os quais foram maturadas em temperatura controlada (8°C) e a temperatura ambiente (~22 °C) por 22 dias. Foram realizadas também as contagens de coliformes termotolerantes, *Staphylococcus* coagulase positiva (SCP), fungos filamentosos e leveduras, bactérias ácido-láticas (BAL) e proteolíticos. A aceitação sensorial foi realizada com QMA, produzidos com “pingo” e “rala” e maturados por 31 dias. Foi utilizado escala hedônica de 9 pontos para aceitação e de 5 pontos para intenção de compra dos queijos. Para a predição do tempo de maturação e do tipo de fermento láctico natural foi empregado o FTIR-ATR. Os espectros foram obtidos no intervalo de 4000-200 cm^{-1} com 4 cm^{-1} de resolução e 32 varreduras acumuladas para formar o espectro final. Os queijos apresentaram pH médio 5 nas diferentes condições de maturação. As amostras refrigeradas e embaladas apresentaram diminuição na acidez, já as maturadas a temperatura ambiente demonstraram aumento neste parâmetro. No geral, houve diminuição da umidade em todas as amostras, sendo mais acentuada nas maturadas a temperatura ambiente. Diretamente ligado à perda de umidade, houve aumento nos teores de cloreto de sódio, proteínas e gorduras e diminuição da atividade de água. O comportamento de *L.m* foi distinto entre as temperaturas de maturação, se mostrando mais resistente às transformações ocorridas nos queijos maturados com controle de temperatura, demonstrando uma população residual de 1,13 e 1,27 log UFC/g ao final dos 22 dias de maturação. Enquanto nos queijos maturados em temperatura ambiente, *L.m* não foi mais detectada a partir do 7º dia de maturação. SCP persistiu com população acima de 3 log UFC/g em todas as condições de maturação. Coliformes termotolerantes, apresentaram contagens médias de 2 log UFC/g ao final dos 22 dias. As contagens das BALs ficaram situadas na faixa de 7 log UFC/g. Fungos e

proteolíticos apresentaram contagens médias de 6 log UFC/g. Em relação a avaliação sensorial, houve diferença na aceitação entre os queijos produzidos com “pingo” e “rala” e maturados em temperatura controlada dos maturados a temperatura ambiente, prevalecendo maiores escores de aceitação nos queijos mantidos a 8°C. A aceitação dos queijos ao longo do período de maturação foi menor naqueles maturados a temperatura ambiente do que os maturados a 8° C. Em relação à predição do tempo de maturação a técnica FTIR-ATR aliada aos métodos quimiométricos mostrou-se capaz de prever, com sucesso, o tempo de maturação do queijo artesanal Serro em torno de 17 dias.

Palavras-chave: Inocuidade de alimentos. Mapa de Preferência. FTIR-ATR. Queijo Artesanal do Serro. *Listeria monocytogenes*.

Abstract

The ripening period corresponds to an important phase in cheese production due to changes in its microbiological, physical-chemical and sensorial properties. Given that, the focus of this research was the ripening process of Serro's Artisanal Minas Cheese (AMC), considering the behavior of *Listeria monocytogenes* (*L.m*), sensorial acceptance and prediction of ripening period through Fourier transform infrared spectroscopy and attenuated total reflectance (FTIR-ATR), as well as physical-chemical determinations of acidity, pH, moisture, fixed mineral residue, sodium chloride, proteins, fat and water activity. To assess the *L.m* behavior, five strains were inoculated (2×10^8 UFC/mL) to the cheeses, which were ripened in controlled temperature (8°C) and ambient temperature (~22°C) for 22 days. Countings of thermotolerant coliform, coagulase positive staphylococcus (CPS), filamentous fungi and yeasts, acid-lactic bacteria (BAL) and proteolytics were also realized. Sensorial acceptance was realized with AMC, produced with endogenous culture “pingo” and “rala” and ripened for 31 days. The hedonic scale of 9 points was used for acceptance and of 5 points for cheeses' buying intention. For predicting the ripening time and type of endogenous culture the FTIR-ATR was used. The spectra were obtained in the interval of 4000-200 cm^{-1} with 4 cm^{-1} of resolution and 32 scans accumulated to form the final spectre. The cheeses presented an average pH of 5 on the several ripening conditions. The refrigerated and packed samples presented decreased acidity, while the ones ripened at ambient temperature showed an increase of this parameter. In general, there was a decrease of moisture in all samples, but higher on the ones ripened at ambient temperature. Directly linked to the moisture loss, there was an increase in sodium chloride content, proteins, fat, and decrease of water activity. The behavior of *L.m* was distinct between the ripening temperatures, being more resistant to the transformations that occurred on cheeses ripened at controlled temperature and showing a residual population of 1,13 and 1,27 log UFC/g at the end of the 22 ripening days, while in cheeses ripened at ambient temperature *L.m* was no longer detected from the 7th ripening day. CPS persisted with a population above 3 log UFC/g in both ripening conditions. Thermotolerant coliforms presented an average counting of 2 log UFC/g at the end of the 22 days. BAL countings were situated at 7 log UFC/g. Fungi and proteolytics presented an average countings of 6 log UFC/g. Regarding sensorial evaluation, there was difference in acceptance between cheeses produced with “pingo” and “rala” and ripened at controlled

temperature from the ones ripened at ambient temperature, with cheeses kept at 8°C presenting higher acceptance scores. The acceptance of cheeses over the ripening period was smaller on those ripened at ambient temperature than the ones ripened at 8°C. Regarding ripening time prediction, the FTIR-ATR technique coupled with chemometric methods was capable of successfully predict the artisanal Serro cheese ripening time in around 17 days.

Key words: Food Safety. Map of Preference. FTIR-ATR. Artisanal Serro Cheese. *Listeria monocytogenes*.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Revisão de Literatura

- Figura 1- Mapa Regiões produtoras de queijo minas artesanal em Minas Gerais.....23
- Figura 2- Mapa Microrregião produtora de queijo minas artesanal do Serro, Minas Gerais.....25
- Figura 3- Fluxograma com as etapas de produção do queijo minas artesanal.....26

Capítulo 1

- Figura 1- Comportamento de *Listeria monocytogenes* em diferentes condições de maturação do queijo minas artesanal do Serro.....62
- Figura 2- Evolução da população de micro-organismos proteolíticos, bactérias acidolácticas e fungos durante a maturação do queijo minas artesanal do Serro em diferentes condições.....65
- Figura 3- Evolução da população de *Staphylococcus coagulase positiva* e coliformes termotolerantes durante a maturação do queijo minas artesanal do Serro em diferentes condições.....68

Capítulo 2

- Figura 1- Mapa de preferência interno, obtido a partir das componentes principais sobre a matriz de covariância, dos dados da aceitação dos consumidores de queijo minas artesanal do Serro produzidos com diferentes fermentos e maturados em diferentes condições em quatro tempos de maturação.....88
- Figura 2- Aceitação sensorial do QMA do Serro produzido com diferentes fermentos endógenos e distintas condições de maturação: refrigerado embalado e ambiente não embalado.....89
- Figura 3- Aceitação sensorial de queijos produzidos com diferentes tipos de fermento em função do tempo de maturação.....90
- Figura 4- Aceitação sensorial de queijos maturados em diferentes condições de maturação em função do tempo.....91
- Figura 5- Intenção de compra de queijos produzidos com diferentes tipos de fermento em função do tempo de maturação.....93
- Figura 6- Intenção de compra de queijos maturados em diferentes condições de maturação em função do tempo.....94

Capítulo 3

Figura 1- Espectros de amostras de queijo minas artesanal do Serro produzidos com diferentes fermentos e maturados em condições distintas e por tempos distintos.....108

Figura 2- Espectros no infravermelho (FTIR-ATR) de queijos minas artesanal do Serro produzidos com diferentes fermentos endógenos.....109

Figura 3- Classificação das amostras na fase de treinamento e validação de amostras de queijo minas artesanal do Serro em relação ao tipo de fermento.....110

Figura 4- Classificação das amostras na fase de treinamento e validação de amostras de queijo minas artesanal do Serro em relação ao tempo de maturação com menos de 17 dias.....113

LISTA DE TABELAS

Capítulo 1

Tabela 1-Parâmetros do modelo de melhor ajuste da inativação de *L. monocytogenes* durante a maturação do QMA do Serro.....63

Tabela 2- Parâmetros físico-químicos do queijo minas artesanal do Serro durante a maturação em diferentes condições.....71

Capítulo 2

Tabela 1- Informações demográficas dos julgadores.....87

Tabela 2- ANOVA do modelo misto para escore sensorial de aceitação das amostras de queijo minas artesanal do Serro.....89

Tabela 3- Média da acidez titulável (% ácido láctico), de pH e percentual médio de cloreto de sódio, umidade e resíduo mineral fixo nas amostras de queijo produzidas com pingo e rala e maturadas em temperatura controlada (8°) e temperatura ambiente ao longo de 31 dias.....96

Capítulo 3

Tabela 1- Parâmetros do modelo de classificação do queijo minas artesanal do Serro em relação ao tipo de fermento utilizado.....111

Tabela 2- Parâmetros do modelo de classificação do queijo minas artesanal do Serro em relação ao tempo de maturação maior ou menor que 17 dias.....113

Sumário

1. Introdução	20
2. Revisão da literatura	22
2.1 Queijo Minas Artesanal:	22
2.2 O Queijo Minas Artesanal do Serro:	23
2.3 Microbiota do queijo minas artesanal	27
2.3.1 Bactérias ácido-láticas: (BAL)	27
2.3.2 <i>Staphylococcus</i> spp.	29
2.3.3. Coliformes totais e termotolerantes:	30
2.3.4 Fungos filamentosos e leveduras	31
2.4 O processo de maturação de queijos	35
2.5 Análise sensorial de queijo artesanal	37
2.6 Espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier e reflectância total atenuada (FTIR-ATR):	37
3. OBJETIVOS	39
3.1 Objetivos gerais	39
3.2 Objetivos Específicos	39
Capítulo 1	52
Comportamento de <i>Listeria monocytogenes</i> durante a maturação do Queijo Minas Artesanal do Serro	52
1. Introdução:	55
2. Metodologia:	56
2.1 Amostras de queijo:	56
2.2 Preparação do inóculo de <i>Listeria monocytogenes</i>	57
2.3 Enumeração da população de <i>Listeria monocytogenes</i>	57
2.4 Detecção de <i>Listeria monocytogenes</i> em amostra controle (sem inoculação)	57
2.5 Análise microbiológica do queijo	58
2.6 Análises Físico-Químicas:	58
2.7 Análise estatística:	59
3. Resultados e discussão:	60
Referências	74
Capítulo 2	79
Efeito do tempo de maturação nas características físico-químicas e sensoriais do queijo minas artesanal da região do Serro.	79
2. Metodologia:	82
2.1 Aquisição e maturação das amostras de queijo:	82
2.2 Análise Sensorial do Queijo Minas Artesanal do Serro	83

2.3 Análises físico-químicas	83
2.4 Delineamento experimental e análise dos resultados	84
3. Resultados e Discussão:	85
Conclusão:.....	95
Referências.....	96
Capítulo 3.....	100
Predição do tempo de maturação e de características de qualidade do Queijo Minas Artesanal do Serro por espectroscopia no infravermelho.	100
1. Introdução:	102
2. Metodologia:	103
2. 1 Aquisição e maturação dos queijos artesanais do Serro:.....	103
2.2 Predição do tempo de maturação e características de qualidade do queijo minas artesanal do Serro por espectroscopia no infravermelho (FTIR-ATR).....	103
2.3 Análise estatística e modelagem:.....	104
3. Resultados e Discussão:	105
4. Conclusão	112
Referências:	113

1. Introdução

No ano de 2016, o Brasil se tornou o quinto produtor mundial de leite estimando-se haver alcançado 34,6 milhões de toneladas (COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO, 2017), destes cerca de 11 bilhões de litros de leite por ano são destinados à produção de diversos queijos, movimentando cerca de 19 bilhões de reais (PORTAL DO QUEIJO, 2016; ZOCCAL, 2016).

O consumo per capita de queijos no Brasil passou de 2,7 Kg por pessoa em 2006 para 5 kg por pessoa em todas as regiões do país (PORTAL DO QUEIJO, 2016, MILKPOINT, 2017). Entretanto, informações sobre produtividade e consumo de queijos artesanais são escassas pelo fato de sua grande maioria ser produzido e vendido em comércios locais ou na informalidade, por ser produzido, predominantemente, em pequenas propriedades rurais que enfrentam dificuldades para regularizar e comercializar a produção frente às exigências da legislação sanitária (VINHA *et al.*, 2010).

O Estado de Minas Gerais se destaca na atividade leiteira, com uma produção de 9,5 bilhões de litros de leite, contudo mais de 60% (6,1 bilhões) destes são reservados a fabricação de queijos por ano (ZOCCAL, 2016).

Uma peculiaridade de Minas Gerais é a produção de queijo minas artesanal (QMA). Os QMA são nomeados de acordo com a região em que são produzidos, como Serro, Serra da Canastra, Serra do Salitre, Araxá, Cerrado, Campo das Vertentes e Triângulo Mineiro. Juntas estas regiões possuem 256 produtores de queijo cadastrados no Instituto Mineiro de Agropecuária (IMA) e produzem cerca de 220,000 toneladas de queijo por ano (MILKPOINT, 2017, IMA, 2018). São queijos de fabricação simples e custo baixo, apresentando relevante significado social econômico e cultural. (PERIN *et al.*, 2017).

A produção do QMA do Serro a partir de leite cru constitui meio adequado a multiplicação de bactérias potencialmente patogênicas. Suas toxinas associado a falhas no controle de boas práticas fabricação podem resultar em um produto de má qualidade. Do ponto de vista sanitário, podem representar importante questão de saúde pública através do risco de causar doenças transmitidas por alimentos nos consumidores (FEITOSA *et al.* 2003; ZAFFARI; MELLO e COSTA, 2007, PINTO *et al.*, 2009).

Entre os produtos lácteos, os queijos, principalmente os de alta e média umidade, ocupam os primeiros lugares no *ranking* em ocorrência de contaminação por *L.*

monocytogenes. Apesar dos queijos serem armazenados em temperatura de refrigeração, este fator não inibe o desenvolvimento da *Listeria* spp. já que este patógeno apresenta comportamento psicrotrófico (BARANCELLI *et al.*, 2011).

Diversos estudos sobre a qualidade microbiológica do queijo minas artesanal do Serro foram realizados, estas pesquisas detectaram elevadas contagens ou a presença de bactérias potencialmente patogênicas, incluindo *Staphylococcus aureus*, *Salmonella* spp, *Escherichia coli* e *Listeria monocytogenes* (PINTO *et al.*, 2004, 2009; BRANT, FONSECA e SILVA, 2007; SANTOS 2010; FIGUEIREDO 2014; MARTINS *et al.*, 2015; BRUMADO 2016).

Uma das formas de melhoria da qualidade microbiológica de um queijo é utilizar o processo de maturação, uma vez que contribui para a junção de fatores físicos, químicos e microbiológicos que desenvolverão as características sensoriais únicas que definem a qualidade do queijo artesanal. Além da questão sensorial, a maturação é critério essencial, definido pela legislação, para garantir a inocuidade dos queijos de leite cru (BERESFORD *et al.*, 2001).

As transformações bioquímicas que ocorrem durante a maturação são responsáveis pela formação do sabor em queijos, esta característica desempenha papel importante na aceitação do produto pelos consumidores (DRAKE *et al.*, 2007). Alguns fatores como o processo de produção, composição do leite, tipo de fermento láctico natural utilizado, tempo e temperatura que os queijos serão maturados são fatores que irão influenciar a qualidade final do produto (KRAGGERUD, NAES, ABRANHANSEM, 2014).

As metodologias convencionais para a determinação da composição de alimentos utilizam de técnicas invasivas, destrutivas e que consomem muito tempo. Logo, existe crescente interesse por técnicas rápidas, não invasivas, de custo baixo e que forneçam informações rápidas sobre o processo de maturação de queijos. (KAROUI *et al.*, 2004, LERMA-GARCIA *et al.*, 2010). Neste sentido, a espectroscopia no infravermelho surgiu como uma ferramenta analítica confiável e rápida para a avaliação objetiva de aspectos de qualidade de alimentos e quando aliado a quimiometria pode fornecer informações sobre parâmetros físico-químicos e sensoriais em queijos. Esta técnica alternativa tem sido usada como ferramenta de controle de qualidade na indústria de alimentos (MAZEROLLES *et al.*, 2001; BLAQUEZ *et al.*, 2004; CHEN *et al.*, 2009; DOMINGOS *et al.*, 2014; ZIELINSKI *et al.*, 2014, MARINHO *et al.*, 2015; BONFATTI, *et al.*, 2016).

A presente pesquisa representa a primeira contribuição para o conhecimento de aspectos relacionados ao processo de maturação do QMA do Serro com vistas a avaliar o comportamento de *L. monocytogenes*, analisar sensorialmente os queijos produzidos com

diferentes fermentos lácticos naturais e utilizar a técnica de espectroscopia no infravermelho para prever o período de maturação e composição dos queijos. É notório que o processo de maturação nos queijos gera alterações importantes nas características físico-químicas, microbiológicas e organolépticas dos queijos. Assim, conhecer os efeitos de tais alterações, torna-se fundamental na busca de melhoria da qualidade do mesmo.

2. Revisão da literatura

2.1 Queijo Minas Artesanal:

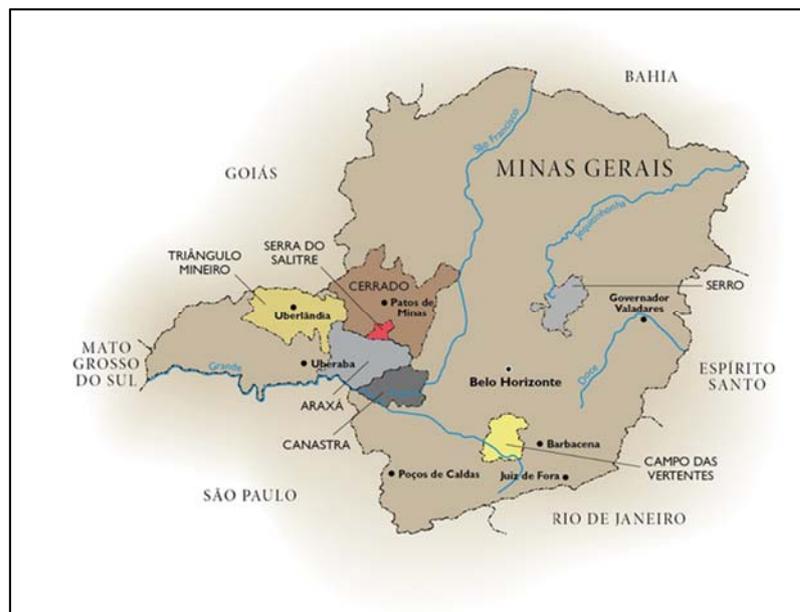
A história do queijo minas está diretamente ligada à chegada dos portugueses ao estado de Minas Gerais em virtude da descoberta das minas de ouro no século XVIII. Com o propósito de conferir um período de conservação maior ao leite, devido a longos trajetos percorridos, os garimpeiros da região produziram um queijo artesanal semelhante ao queijo Serra da Estrela, de Portugal. À medida que estes exploradores percorriam novas áreas, a fabricação do queijo artesanal se propagava para todo o Estado (INSTITUTO DO PATRIMÔNIO HISTÓRICO E ARTÍSTICO NACIONAL- IPHAN, 2014).

Com o declínio das minas de ouro e diamante no Estado, a agricultura e pecuária se firmaram como atividade de destaque para economia local, conseqüentemente o queijo minas surgiu como produto diferenciado que garantiu recursos para a região. Desde então, esse queijo se tornou parte da cultura de um povo, passada de geração para geração e um patrimônio a ser preservado (IPHAN, 2014).

O Queijo Minas Artesanal (QMA) é caracterizado pela produção a partir do leite integral de vaca, fresco e cru, retirado e beneficiado na propriedade de origem, conforme a tradição histórica e cultural da área onde for produzido. O produto final deve apresentar consistência firme, cor e sabor próprios, massa uniforme, com ou sem olhaduras mecânicas e isento de corantes e conservantes (MINAS GERAIS, 2002).

Em Minas Gerais, atualmente são reconhecidas sete microrregiões produtoras de QMA: Serro, Serra da Canastra, Serra do Salitre, Araxá, Cerrado, Campo das Vertentes e Triângulo Mineiro (Figura1) consideradas tradicionais, estas regiões juntas compreendem 256 produtores de queijo cadastrados no Instituto Mineiro de Agropecuária e produzem cerca de 220,000 toneladas de queijo por ano (MILKPOINT, 2017, IMA, 2018).

Figura 1- Mapa Regiões produtoras de queijo minas artesanal em Minas Gerais



Fonte: Amarante, J. O. A. Regiões demarcadas. Disponível em: <https://www.amarante-vinhos.com.br/outras-paix%C3%B5es/minas-artesanal/regi%C3%B5es-demarcadas/>

Inicialmente, quatro regiões foram identificadas como produtoras de QMA: Araxá, Serro, Cerrado e Canastra. Somente em 2009 a região do Campo das Vertentes foi identificada oficialmente como produtora de QMA (IMA, 2009). Recentemente foi identificada a região do Triângulo Mineiro (IMA, 2013). Enquanto Serra do Salitre há pouco tempo separou-se da microrregião do Cerrado (IMA, 2014).

O estado de Minas Gerais se destaca como produtor de queijos minas artesanais, sendo este produzido há mais de 200 anos em diversas cidades do estado, fazendo parte da cultura e economia mineira. De tal maneira que, em 15 de maio de 2008, o IPHAN tombou como Patrimônio Cultural Imaterial o modo artesanal de fazer queijo Minas (BRUMADO, 2016).

2.2 O Queijo Minas Artesanal do Serro:

A microrregião do Serro localizada no médio espinhaço possui uma área geográfica de 6992,86 Km² e uma população de aproximadamente 104.384 habitantes e uma densidade populacional de 14,927 habitantes/km² considerada baixa, caracterizando-se por uma região predominantemente rural (INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA, 2017).

O QMA do Serro apresenta formato cilíndrico, sem abaulamento na superfície e na lateral, pesam 0,7 a 1,2 kg, possuem aproximadamente 15 a 16 cm de diâmetro e altura variando de 4 a 8 cm. É um queijo com casca esbranquiçada quando fresca e amarelada se maturada. Exibe massa cega sem ou com poucas olhaduras de distribuição uniforme do tipo mista, ou seja, mecânica e microbiana (MENESES, 2006; NÓBREGA, 2012).

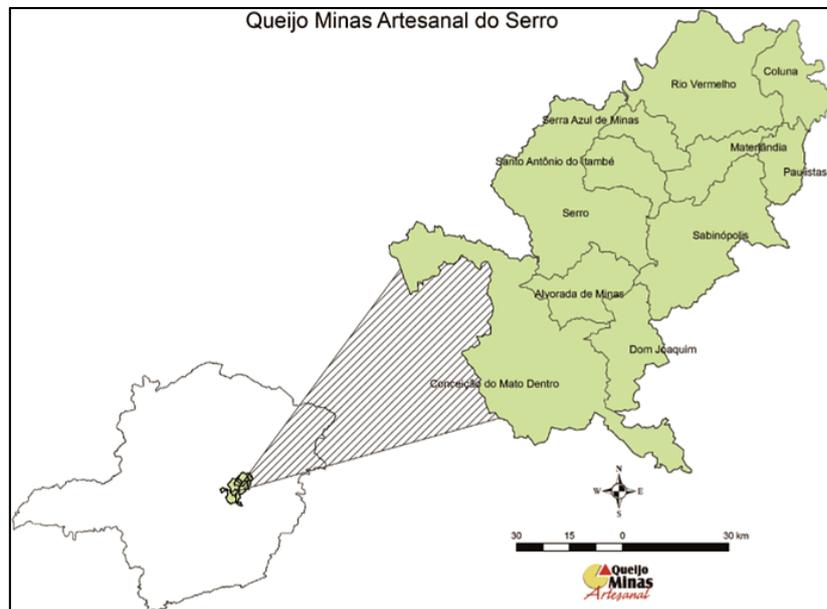
Os municípios produtores de queijo minas artesanal que compõem a região do Serro são (Figura 2): Alvorada de Minas, Conceição do Mato Dentro, Dom Joaquim, Materlândia, Paulistas, Rio Vermelho, Sabinópolis, Santo Antônio do Itambé, Serra Azul de Minas, Coluna e Serro (EMATER, 2016).

Segundo a Associação dos produtores artesanais de queijo do Serro (CoopSerro), a região conta com cerca de 1000 produtores de queijo artesanal, com produção diária de 10 toneladas. Cerca de 20% dos queijos produzidos são comprados pela CoopSerro, onde são classificados, embalados, identificados com o número do produtor e distribuídos para o varejo sendo que 80% da produção são vendidos para intermediários, comerciantes que buscam os queijos nas fazendas e sítios (IPHAN, 2014).

O QMA do Serro foi nomeado como o primeiro patrimônio cultural imaterial de Minas Gerais, possui também inscrição no “Livro dos Saberes” pelo Instituto Estadual do Patrimônio Histórico e Artístico de Minas Gerais (IEPHA-MG), devido a prática tradicional de produção do queijo (MARTINS, 2006).

As etapas de fabricação do queijo minas artesanal são apresentadas no fluxograma (Figura 3) este processamento se baseia em técnicas tradicionais passadas de pai para filho, em que o leite cru é retirado na própria fazenda e se adiciona coalho, “pingo” ou “rala”. Esta tecnologia de produção é comum às regiões produtoras de QMA. No entanto o ingrediente que diferencia um queijo do Serro de outro queijo produzido em outra região é o fermento natural láctico (IPHAN, 2014).

Figura 2- Microrregião produtora de queijo minas artesanal do Serro, Minas Gerais.



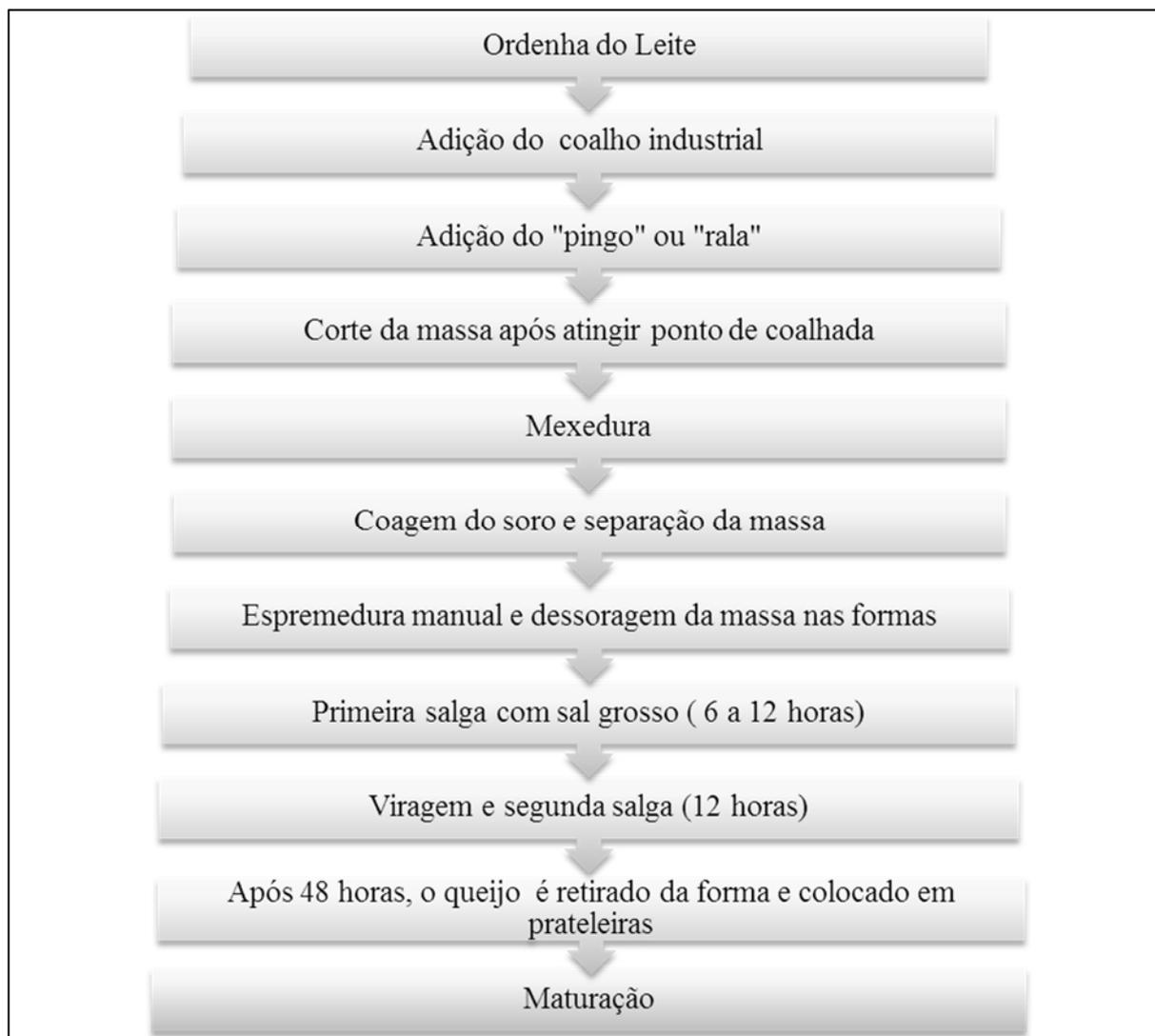
Fonte: As Regiões Queijeiras de Minas Gerais. <https://www.chicoseverino.com/single-post/2017/04/26/Blog-5-ElementosAs-Regi%C3%B5es-Queijeiras-de-Minas-Gerais>.

O “pingo” é obtido através da coleta do soro fermentado, de queijos já salgados, provenientes da produção do queijo do dia anterior, coletado a partir do segundo dia de produção (BORELLI *et al.*, 2006; CARDOSO *et al.*, 2013; 2015; PERIN *et al.*, 2017). Além de conferir sabor ao queijo, a microbiota endógena do pingo pode promover a inibição de alguns micro-organismos indesejáveis, além de direcionar a fermentação nos próximos queijos e possibilitar uma maturação adequada (NÓBREGA, 2012).

Alguns produtores de queijo do Serro estão utilizando como fermento láctico, denominado “rala”, o próprio queijo maturado ralado produzido em um lote anterior, em substituição ao pingo (FIGUEIREDO, 2014). A tradição de produzir o queijo minas artesanal com pingo faz parte do saber fazer da região do Serro. Um pingo de boa qualidade necessita interagir com a madeira para desenvolver sua capacidade de fermentação e cura dos queijos (IPHAN, 2014). No entanto a legislação estadual (Minas Gerais, 2002) prevê a substituição dos equipamentos e utensílios de madeira por materiais de mais fácil limpeza como fibra de vidro, polipropileno, aço inox e plástico. Segundo os produtores de queijo estas alterações ocasionaram um queijo com textura muito macia, não aceito pelo mercado consumidor. A solução encontrada na busca de corrigir este problema foi utilizar a rala que corresponde ao queijo maturado até 7 dias ralado. Apesar de ter resolvido a questão tecnológica, a utilização deste fermento natural

lático pode causar alterações indesejáveis nas características físico-químicas, microbiológicas e principalmente sensoriais (BRUMADO, 2016).

Figura 2- Fluxograma com as etapas de produção do queijo minas artesanal.



Fonte: Instituto do Patrimônio Histórico e Artístico Nacional, Modo artesanal fazer queijo minas, 2014.http://portal.iphan.gov.br/uploads/publicacao/Dossie_Queijo_de_Minis_web.pdf

A produção do queijo artesanal ocorre na propriedade rural sendo realizada de forma manual, desprovida de mecanização. O local de processamento, chamado de “casa do queijo” ou “quarto de queijo”, frequentemente é localizado ao lado do curral. A ordenha do leite geralmente é manual e este não é submetido a nenhum tratamento térmico ou processo similar. Desta forma o consumo e comercialização do queijo pode representar um problema

de saúde pública pelo risco de veicular micro-organismos patogênicos (BRANT, FONSECA e SILVA, 2007).

A melhoria da qualidade microbiológica dos queijos preparados com leite cru pode ser atingida com implantação de Boas Práticas de Fabricação (BPF), Boas Práticas Agropecuárias (BPA), matéria prima de qualidade, aliados ao tempo e temperatura de maturação, a atuação das bactérias ácido-lácticas contra os patógenos, além da adição de cloreto de sódio na fabricação do queijo. Juntos, estes fatores podem garantir a inocuidade do queijo artesanal para os consumidores (DORES e FERREIRA, 2012).

Com o intuito de viabilizar a expansão da comercialização do queijo artesanal, o Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA), publicou a Instrução Normativa nº 57, de 15 de dezembro de 2011, permitindo que os queijos artesanais tradicionalmente elaborados a partir de leite cru sejam maturados por um período inferior a 60 dias, quando estudos técnico-científicos comprovarem que a redução do período de maturação não compromete a qualidade e a inocuidade do produto. Já a legislação mineira, por meio da Portaria nº1305, de 30/04/2013, do IMA, estabelece o período mínimo de 17 dias de maturação para o queijo produzido na microrregião do Serro quando maturado em temperatura ambiente. Assim, assume-se que o período mínimo de 17 dias de maturação seja suficiente para a segurança do produto e, concomitantemente, estabelecer as características sensoriais típicas desse queijo artesanal.

2.3 Microbiota do queijo minas artesanal

2.3.1 Bactérias ácido-lácticas: (BAL)

As BAL são anaeróbicas aerotolerantes, se apresentam na forma de cocos ou bacilos, gram-positivas, catalase negativas, não exibem motilidade e não esporulam (JAY, 2005).

É um dos principais grupos microbianos encontrados no leite cru e em queijos de leite cru, durante preparo e maturação do queijo pode desempenham papel importante na inocuidade devido as suas propriedades tecnológicas e seu potencial biopreservador (ALEGRÍA *et al.*, 2009; ORTOLANI *et al.*, 2010; PERIN *et al.*, 2015; PICON *et al.*, 2015).

As BAL são micro-organismos desejáveis em QMA, uma vez que podem colaborar no processo de inocuidade deste produto, possuem a capacidade de fermentar a lactose, diminuindo a disponibilidade desse carboidrato para fermentações indesejáveis e, também produzindo ácidos orgânicos (BRUNO e CARVALHO, 2009). A fermentação da lactose

causa redução do pH do meio que contribui para a inibição do desenvolvimento de micro-organismos patogênicos. Além disso, as BAL podem produzir substâncias antagonistas (bacteriocinas) ao desenvolvimento de micro-organismos indesejáveis (RILEY e WERTZ, 2002).

Durante a fermentação da lactose o ácido láctico produzido por *Lactobacillus* spp. e *Lactococcus* spp. podem inibir patógenos alimentares como *S. aureus* e *L. monocytogenes* em produtos lácteos (CHIODA *et al.*, 2007).

Em estudo realizado por Perin *et al.* (2017), caracterizando a diversidade microbiana de cinco variedades de QMA (Serro, Campo das Vertentes, Araxá, Canastra e Serra do Salitre), foi detectado que as contagens de BAL foram relativamente uniformes nas cinco variedades de queijos, indicando a relevância desta microbiota no queijo artesanal mineiro.

Em pesquisa realizada por Rezende *et al.* (2011) a contagem de bactérias ácido-lácticas foi de 7,5 log UFC/g em QMA da Serra da Canastra. *Lactobacillus* foi o gênero de BAL mais frequentemente isolado, sendo *Lactobacillus rhamnosus* a espécie mais frequente dentro deste gênero, seguido por *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus hilgardii* e *Lactobacillus paraplantarum*. Por outro lado, em estudo realizado por Caro *et al.* (2013) em queijo artesanal Mexicano Oaxaca, as contagens médias de BAL encontradas superaram 6 log UFC/g, sendo a espécie predominantemente detectada *Lactobacillus plantarum*.

Ortolani *et al.* (2010) isolaram BAL de queijos feitos com leite cru com potencial atividade antagonista contra *L. monocytogenes*, *Salmonella* e *S. aureus*. Na maioria das amostras a contagem das BAL se situou entre 7 e 8 log UFC/g. Entre os isolados testados, 61% exibiram atividade antagonista frente a *L. monocytogenes*, 11% frente a *S. aureus* e nenhuma frente a *Salmonella*.

Morandi *et al.* (2015) isolaram 16 espécies de BAL obtidas de queijo artesanal *Valtellina Casera* na Itália. No processamento do queijo, o gênero predominante na coalhada foi *Streptococcus termophilus*, apresentando decréscimo durante a produção do queijo. Contudo, as contagens de *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus paracasei* e *Lactobacillus rhamnosus* aumentaram da etapa da coalhada para queijo maturado por 70 dias.

2.3.2 *Staphylococcus* spp.

As bactérias do gênero *Staphylococcus* são cocos gram-positivos, pertencentes à família *Micrococcaceae*. São anaeróbias facultativas, com maior crescimento sob condições aeróbias, quando então produzem catalase. São bactérias mesófilas apresentando temperatura ótima de crescimento na faixa de 7 a 47,8° C, produzindo toxinas entre 10° C e 46° C. As bactérias deste gênero são tolerantes a concentrações de 10% a 20% de cloreto de sódio e a nitratos, o que torna os alimentos curados veículos potenciais para as mesmas (SILVA *et al.*, 2010).

S. aureus produzem toxinas estafilocócicas nos alimentos quando detectadas em taxas iguais ou superiores a 10⁶ UFC/g de alimento. A intoxicação é provocada pela ingestão do alimento que apresenta a toxina pré-formada. No desenvolver da intoxicação alimentar os sintomas exibidos variam de acordo com o grau de suscetibilidade do indivíduo a concentração da enterotoxina no alimento e quantidade consumida do alimento (FRANCO e LANDGRAF, 2003). Os sintomas são observados, normalmente, entre duas e seis horas depois da ingestão incluindo, náuseas, vômitos, cólicas, prostração, pressão baixa e queda de temperatura (SILVA *et al.*, 2010). A espécie *S. aureus* é a que está associada, mais frequentemente, às doenças estafilocócicas de origem alimentar ou não (JAY, 2005).

O principal reservatório de *S. aureus* são os seres humanos e os animais de sangue quente, ocorrendo nas vias nasais, garganta, pele e cabelo. Os manipuladores são a fonte mais frequente de contaminação e o úbere infectado de vacas leiteiras são uma fonte de contaminação comum do leite (SILVA *et al.*, 2010). Segundo Castro (2015), *S. aureus* encontrado em leite geralmente está associado à mastite e condições insalubres de higiene durante a ordenha do leite, gerando prejuízos à produção de leite e derivados.

S. aureus ocupa o terceiro lugar como agente etiológico de surtos envolvendo alimentos no Brasil, No ano de 2017 foi identificado como o terceiro maior agente causador de surtos (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2017). No entanto, este valor pode ser subestimado devido à falta de atendimento médico da população atingida por estas doenças transmitidas por alimentos e através de subnotificações dos surtos.

Diversas pesquisas realizadas em queijos artesanais obtiveram elevada contaminação (acima de 70% das amostras) apresentando contagens de *Staphylococcus* superiores a 3 log UFC/g, entre estas, tem-se: Loguercio e Aleixo 2001; Borges *et al.*, 2003 e 2007; Feitosa *et*

al., 2003; Borelli *et al.*, 2006; Brant, Fonseca e Silva., 2007; Carvalho *et al.*, 2007; Moraes *et al.*, 2009, Viana *et al.*, 2009; Rezende *et al.*, 2010; Willians e Withers, 2010; Gundogan e Avci Ebru, 2014.

2.3.3. Coliformes totais e termotolerantes:

Coliformes totais (CT) são grupos de bactérias da família *Enterobacteriaceae*, capazes de fermentar lactose com produção de gás, quando incubados a 35 ° C por 48 horas. São bacilos gram-negativos e não formadores de esporos (SILVA *et al.*, 2010). Enquanto os coliformes termotolerantes correspondem aos coliformes totais que apresentam a capacidade de continuar fermentando a lactose com produção de gás, quando incubados a temperatura de 45° C (FRANCO e LANDGRAF, 2003).

Coliformes termotolerantes constam como parâmetro de qualidade sanitária para, praticamente, todos os alimentos, incluindo os leites e derivados. Esse grupo de bactérias são consideradas indicadores de contaminação fecal, sugerindo práticas de fabricação inadequadas. Populações superiores a 2 log UFC/g de queijo são considerados práticas de processamento insatisfatórias (CHAMBERS, 2002; PERIN *et al.*, 2017).

A pesquisa de coliformes tolerantes e *E.coli* fornece com maior segurança, indicação sobre condições higiênicas e sanitárias dos alimentos, além da possível presença de outros enteropatógenos (JAY, 2005).

Moraes *et al.* (2009); Willians e Withers, (2010); Fava *et al.* (2012) detectaram CT em todas as amostras analisadas apresentando contagens acima de 7 log UFC/g de queijo, já em estudo realizado por Borges *et al.* (2003); Rezende *et al.* (2010) e Melo *et al.* (2013) 74,4%, 65,2% e 58% das amostras de queijo artesanal apresentaram resultados acima dos permitidos pela legislação para o grupo coliforme respectivamente.

Contagens acima de 2 logUFC/g de *E. coli* em amostras de queijo sugere práticas de higiene inadequadas durante transporte e fabricação de queijos. Em estudo realizado por Gundogan e Avci Ebru, (2014), na Turquia, relata contaminação por *E. coli* em 60% das amostras de queijos analisadas, com contagens variando de 1 a 6,2 log UFC/g. Já na pesquisa do perfil microbiológico de queijos artesanais produzidos na Escócia, Willians e Withers (2010) detectaram 84% dos queijos contaminados com *E. coli*. No Brasil, *E.coli* foi detectada

em todas as amostras de queijos artesanais analisadas por Borges *et al.* (2003); Moraes *et al.* (2009); Fava *et al.* (2012).

Silva e Silva (2013) analisando queijos coloniais com e sem inspeção em Francisco Beltrão, Paraná encontraram contagens entre >3 a <11.000 NMP/g para coliformes totais e termotolerantes, respectivamente.

2.3.4 Fungos filamentosos e leveduras

Os fungos filamentosos e leveduras constituem um grupo de micro-organismos com origem no solo ou ar. Estes micro-organismos são bastante resistentes a condições adversas como pH ácido e atividade de água baixa. A temperatura ótima de crescimento encontra-se na faixa de 25° C a 28° C. Os fungos filamentosos necessitam de oxigênio para o seu crescimento sendo considerados aeróbios estritos, ao passo que as leveduras são capazes de crescer em diferentes concentrações de CO₂ e completa ausência de oxigênio. (SILVA *et al.*, 2010).

Fungos filamentosos e leveduras, mesmo que em quantidades mínimas, são, frequentemente, encontrados em leite. Uma vez presentes no leite podem contaminar o queijo, ocasionando tanto a deterioração do produto quanto a possível produção de micotoxinas, substâncias lesivas ao homem. Falhas nas condições higiênico-sanitárias da obtenção do leite e nos procedimentos de conservação contribuem para a elevação de suas contagens no alimento (MELVILLE *et al.*, 2006)

Por outro lado, muitos fungos são comestíveis e utilizados na alimentação humana. É o caso dos cogumelos, como o champignon e o shitake. Outros fungos são utilizados na produção de bebidas alcoólicas, vinho e a cerveja e na produção de alimentos como pão e queijo, sendo neste último, responsável por conferir sabores característicos da maturação (BRITTES, 2007)

Em estudos sobre detecção de fungos filamentosos e leveduras em queijo Canastra e Serra do Salitre, Borelli *et al.* (2006) e Lima *et al.* (2009) puderam constatar contagens entre $3,9 \times 10^7$ UFC/g $1,8 \times 10^4$ UFC/g respectivamente.

Silva *et al.* (2010) em estudo sobre qualidade microbiológica de queijo coalho produzido em três laticínios do interior do Alagoas encontraram fungos filamentosos e leveduras com contagens superiores a 4 log UFC/g em todos os lotes analisados.

Feitosa *et al.* (2003) ao analisar amostras de queijo coalho e manteiga produzidos no Rio Grande do Norte puderam verificar a presença de fungos filamentosos e leveduras com contagens variando de $1,9 \times 10^4$ a $4,8 \times 10^8$ UFC/g e $1,5 \times 10^4$ a $2,8 \times 10^8$, respectivamente. Silva e Silva, (2013) notaram contagens de fungos e leveduras em queijos coloniais variando entre 2×10^1 a $2,4 \times 10^6$ UFC/g.

2.3.5 Micro-organismos Proteolíticos:

Os micro-organismos proteolíticos degradam as proteínas através das proteases em peptonas, polipeptídios e dipeptídios em aminoácidos. Posteriormente, a degradação dos aminoácidos leva a odores desagradáveis característicos de muitos alimentos deteriorados (MARCY e PRUETT, 2001).

Entre os micro-organismos proteolíticos destacam-se o gênero *Acinetobacter*, *Flavobacterium*, *Bacillus*, *Clostridium*, *Enterobacter*, *Micrococcus*, *Pseudomonas* e *Proteus*. Também há diversos fungos e leveduras proteolíticas. A atividade proteolítica de algumas bactérias psicotróficas podem causar alterações indesejáveis em produtos armazenados sob refrigeração por longos períodos (MARCY e PRUETT, 2001).

As enzimas produzidas por micro-organismos proteolíticos e lipolíticos presentes no leite cru influenciam diretamente na qualidade de produtos como queijos, pois estas geram alterações de cor e odor no leite, perda da consistência pela formação de coágulos na fabricação de queijos e a geleificação do leite longa vida (SANTANA, 2001; CHEN *et al.*, 2003; NORBERG *et al.*, 2010).

As bactérias proteolíticas psicotróficas também podem gerar alterações indesejáveis em produtos armazenados sob refrigeração por longos períodos. Por outro lado, esta atividade proteolítica pode ser desejável em certos alimentos como queijos maturados, pela contribuição no desenvolvimento do sabor, consistência e textura (MARCY e PRUETT, 2001).

Moreira e Montanhini (2014) ao estudarem a incidência de contaminação do leite por micro-organismos lipolíticos e proteolíticos durante a ordenha em propriedades leiteiras encontraram que 44% das amostras apresentavam micro-organismos lipolíticos e 11% apresentaram micro-organismos proteolíticos. Já Pinto *et al.* (2015) isolou de leite cru refrigerado 136 bactérias psicotróficas proteolíticas, destas 28% eram gram-positivas e 78%

gram-negativas. Estas apresentavam alto poder deteriorador associado à produção de enzimas proteolíticas e lipolíticas além de capacidade de adesão na superfície de aço inoxidável.

Sangaletti *et al.* (2009) avaliaram as alterações de queijos minas frescal durante armazenamento por 30 dias a 4° C e encontraram um aumento na população de micro-organismos proteolíticos. As contagens médias variaram de 2,04 log UFC/g no primeiro dia a 9,77 log UFC/g no trigésimo dia.

2.3.6 *Listeria monocytogenes*:

São pequenos bastonetes gram-positivos não esporogênico, catalase positiva. Crescem numa ampla faixa de temperatura de 1° C a 45° C, com o ótimo entre 30 e 37° C. São classificados como psicrotolerantes em função da capacidade de multiplicar em temperaturas de refrigeração, crescem em pH de 4,1 a 9,6, se desenvolvem em concentrações de sal superiores a 5% e também em condições de ausência de oxigênio (HEQUET *et al.*, 2007, JAY *et al.*, 2005, MELLEFONT e ROOS, 2007; MURPHY *et al.*, 2005; SKANDAMIS *et al.*, 2008; WARRINER e NAMVAR 2009).

Listeriose é a doença de origem alimentar transmitida por *L. monocytogenes*, sendo esta uma doença grave com uma taxa média de mortalidade de pelo menos 20% (CHAN e WIEDMANN, 2009), provocando a infecção principalmente em indivíduos imunocomprometidos e aqueles em idades extremas, como recém-nascidos e idosos (RODRIGO-LÁZARO, COOK e HERNANDEZ, 2013).

Os principais alimentos envolvidos em surtos de listeriose são os produtos cárneos, frutos do mar prontos para consumo e os queijos pastosos, que é atribuído às suas características intrínsecas, como alto teor protéico, moderada atividade de água e poucos micro-organismos competidores (WARRINER e NAMVAR, 2009).

A contribuição do queijo como alimento vetor em surtos DTA's tem sido revisado continuamente (JOHNSON *et al.*, 2001; DONNELLY 2001, 2005; CHOI *et al.*, 2016) e as indicações são de que o queijo tem sido pouco frequente envolvido em surtos DTA's. Além disso, uma comissão do Food and Drug Administration (FDA) analisou quantitativamente o risco de *L. monocytogenes* em queijo maturado, sendo este classificado como baixo risco na avaliação do risco de *L. monocytogenes* em produtos prontos para o consumo (FDA, 2003; 2012).

A legislação brasileira, através da Resolução da Diretoria Colegiada (RDC) de nº 12, de 2 de janeiro de 2001, publicada pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), que regulamenta os padrões técnicos microbiológicos para alimentos, estabelece padrões para a *L. monocytogenes* em apenas alguns tipos de queijos, de média, alta e muito alta umidade, especificando a ausência do micro-organismo em 25g do produto. Para os demais produtos alimentícios não há limites pré-estabelecidos para esse micro-organismo (BRASIL, 2001).

Jakobsen *et al.* (2011) pesquisaram sobre a presença de *L. monocytogenes* em queijos artesanais produzidos em pequena escala na Noruega e como resultado detectaram *L. monocytogenes* em 1 (1,4%) de 71 amostras de queijo de leite bovino.

Kobayashi *et al.* (2017) em estudo sobre a presença de *L. monocytogenes* em queijos informais produzidos em São Paulo não a identificaram em nenhuma amostra analisada. Seguindo esta mesma linha de pesquisa Barancelli *et al.* (2011) também não detectaram *L. monocytogenes* em nenhuma amostra de queijo feito com leite cru e pasteurizado. Outros estudos realizados em queijos artesanais em que não foram detectadas a presença de *L. monocytogenes*, entre eles, tem-se: Brant, Fonseca e Silva (2007), Silva, M. *et al.*, (2010), Fava *et al.*, (2012).

Por outro lado, *Listeria* spp. foi constatada em 9% e 15% das amostras de queijos coalho e manteiga analisadas, respectivamente por Feitosa *et al.* (2003). Zaffari, Melo e Costa (2007) encontraram 16% das amostras de queijo colonial contaminadas com *Listeria* spp. sendo 3,7% identificadas como *L. monocytogenes*. O total de 12 (17%) amostras analisadas por Sousa *et al.* (2006) apresentaram-se contaminadas com *Listeria* spp., sendo duas positivas para *L. monocytogenes*. Borges *et al.* (2003) encontraram 6,9% das amostras contaminadas com *Listeria* spp com confirmação de *L. monocytogenes* em 2,3% dessas. Avaliando a incidência de *Listeria* spp. em queijo coalho. Branco *et al.* (2003) verificou a presença de *L. monocytogenes* em 19% das amostras.

De acordo com Silva, *et al.* (2010) nos anos de 2000 a 2009, o total de 3428 amostras de queijos foram analisadas quanto à presença de *Listeria* spp. e *L. monocytogenes* no Brasil, sendo detectadas 111 amostras positivas para a presença de *L. monocytogenes* em queijos.

Algumas pesquisas realizadas em queijo artesanal do Serro envolvendo a detecção de *L. monocytogenes* na maturação foram realizadas, entre elas tem-se: Martins *et al.* (2015) que não detectaram a presença de *L. monocytogenes* em nenhuma das 128 amostras de queijos analisados. Brumado (2016) constatou que o processo de maturação mostrou-se imprescindível para redução dos patógenos presentes nos queijos. *L. monocytogenes* foi

detectada após dois dias de fabricação em 11 dos 12 queijos analisados, porém não foi mais detectada com 8 dias de maturação. Entretanto em estudo realizado por Pinto et al. (2009), *Listeria innocua* conseguiu sobreviver ao processo de maturação demonstrando, ao final de 60 dias, contagens superiores a 3 log UFC/g.

2.4 O processo de maturação de queijos

Os cuidados durante as etapas de fabricação do queijo produzido a partir de leite cru devem ser intensificados, uma vez que o leite não recebe nenhum tipo de processamento que possa eliminar focos de contaminação (MARTINS, 2006).

Uma das formas de melhoria da qualidade microbiológica de um queijo minas artesanal é promover a sua maturação, já que ela contribui para a junção de fatores físicos, químicos e microbiológicos, considerados fundamentais para a segurança do queijo (BERESFORD *et al.*, 2001).

A finalidade da maturação é converter a massa fresca semelhante em todos os tipos de queijo, em variedades de queijo totalmente distintas, no que diz respeito à aparência, sabor, aroma, textura e funcionalidade. Esta transformação se dá através do metabolismo residual da lactose, do lactato e citrato, pela lipólise e metabolismo de ácidos graxos e por meio da proteólise e catabolismo de aminoácidos (McSWEENEY, 2011).

Um dos principais processos bioquímicos que ocorrem durante a maturação de queijos artesanais são a proteólise e lipólise. A proteólise é uma etapa complexa e de grande importância para a peculiaridade dos queijos. Neste período ocorrem mudanças na textura e funcionalidade do queijo com consequente contribuição para o desenvolvimento do sabor. O catabolismo dos aminoácidos gera compostos aromáticos que determinarão as propriedades sensoriais únicas dos queijos (PERRY, 2004, McSWEENEY, 2011). Já a lipólise através da liberação de compostos, promoverá a formação de sabor e aroma típicos dos queijos maturados (CABEZAS *et al.*, 2005).

No decorrer do processo de maturação pode ser observado um aumento no teor de gorduras, redução do pH, modificações no teor da massa seca, um aumento da acidez titulável e decréscimo no conteúdo de lactose devido a sua fermentação e produção de ácido láctico (GALÁN *et al.*, 2012, LAVASANI *et al.*, 2011).

Pesquisas que descrevem o papel da maturação na segurança de queijos artesanais está bem documentada na literatura, como Manolopoulou *et al.* (2003); Flórez (2006); Kongo *et al.* (2009); Bertolino, (2011). Entre as pesquisas publicadas no Brasil, temos estudos de Dorez *et al.* (2013) e Martins *et al.* (2015) que analisaram o período mínimo de maturação necessário para atingir a segurança microbiológica do queijo artesanal da Canastra e do Serro. A definição do período de maturação se deu com as contagens de *Staphylococcus aureus*, devido à persistência dessa bactéria ao longo do período de maturação, inclusive com contagens acima do permitido pela legislação brasileira. A ausência de *S. aureus* ocorreu aos 17 e 22 dias de maturação a temperatura ambiente para a região do Serro e Canastra respectivamente,

Brumado (2016) constatou que o processo de maturação mostrou-se imprescindível na redução dos patógenos presentes no queijo (*S. aureus*, *Escherichia coli* e coliformes) Também foi objeto de estudo da autora, a interferência do tipo de fermento láctico utilizado na fabricação dos queijos do Serro evidenciando que os queijos produzidos com fermento tradicional (“pingo”) atingiram contagens exigidas pela legislação com 17 dias de maturação, porém os queijos produzidos com “rala” atingiram esta condição somente após 27 dias.

A temperatura em que a maturação ocorre é de extrema importância para o direcionamento da microbiota. Sabe-se que a temperatura ambiente leva à fermentação desejável, pois favorece a fermentação láctica inibindo o crescimento de microrganismos indesejáveis como os deterioradores e potencialmente patogênicos presentes no leite cru (DORES, *et al.*, 2013; MARTINS *et al.*, 2015).

A comercialização dos queijos artesanais baseia-se na suposição que as modificações da composição e as características físico-químicas do queijo serão suficientes para garantir sua inocuidade ao longo do processo de maturação (SCHVARTZMAN *et al.*, 2011).

Durante a maturação, assim como durante a fabricação, as características intrínsecas do queijo e suas propriedades físico-químicas (por exemplo, atividade de água, pH, temperatura e teor de ácido láctico) vão regular o comportamento dos micro-organismos, incluindo os patogênicos. Porém o dinamismo particular destes parâmetros torna este comportamento muito imprevisível e pode não garantir, por si só, a inocuidade do queijo (SCHVARTZMAN *et al.*, 2011).

2.5 Análise sensorial de queijo artesanal

A análise sensorial é definida pela Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT) como a medida científica usada para evocar, medir, analisar e interpretar reações referentes a características dos alimentos e materiais e como estas são percebidas pelos sentidos da visão, olfato, gosto, tato e audição (ABNT, 2014).

Os parâmetros sensoriais podem seguir abordagem discriminativa, contribuindo para avaliar as diferenças entre duas ou mais amostras; afetiva, analisando a aceitação e preferência dos consumidores com relação à amostra e a metodologia descritiva, descrevendo e quantificando as características sensoriais das amostras (DRAKE, 2007).

Os testes de aceitação são empregados para verificar o quanto uma pessoa gosta ou desgosta do produto de forma individual. Pode-se avaliar conjuntamente ao teste de aceitação a intenção de compra do produto testado, sendo que este sempre condiz com a amostra mais aceita pelo julgador, ou seja, os testes de aceitação medem a disposição do consumidor em comprar ou consumir determinado produto (FARIA e YOTSUYANAGI, 2008).

A análise sensorial implica na utilização de um grupo de provadores com sensibilidade e capacidade para reproduzir as sensações, o que assume grande importância para a validade dos resultados (ORVALHO, 2010). A escala hedônica é muito utilizada, pois possui uma ampla faixa de aplicação, requer menos tempo para a avaliação, é de fácil compreensão para o provador e pode ser utilizada com grande número de estímulos sensoriais (TORRES, 2004)

As características sensoriais de um alimento são preceitos importantes para aceitação ou rejeição do produto pelo consumidor. Em se tratando de queijos há vários fatores que podem afetar aceitação destes pelo consumidor entre eles temos forma de produção, tipo de fermento natural utilizado, tempo e temperatura de maturação (NÓBREGA, 2012).

2.6 Espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier e reflectância total atenuada (FTIR-ATR):

A caracterização do período de maturação através de análises físico-químicas e composição dos alimentos baseiam-se em técnicas trabalhosas, que demandam tempo, geram resíduos e exigem profissionais qualificados na realização dos ensaios. Dessa forma, há

necessidade de desenvolver métodos de baixo custo, rápidos, confiáveis e padronizados com o intuito de determinar aspectos de qualidade dos alimentos, particularmente, os aspectos de qualidade na maturação dos queijos artesanais. Neste contexto, a espectroscopia desponta com um enorme potencial para obtenção rápida de informações sobre a composição química e os aspectos de maturação de queijos (CHEN *et al.*, 2009; MARINHO *et al.*, 2015, CURRÒ *et al.*, 2017)

A espectroscopia com transformada de Fourier tem sido muito utilizada para investigar a composição de produtos lácteos, identificando bandas associadas a proteínas, gorduras, lactose e ácido lático. Também tem sido empregado na caracterização do período de maturação de queijos, avaliando a sua composição, parâmetros sensoriais e de textura e identificação geográfica (KAROURI, *et al.*, 2005; RODRIGUES e SAONA *et al.*, 2006; BLASQUEZ *et al.*, 2006, LERMA-GARCIA *et al.*, 2010; GONZÁLEZ-MARTÍN *et al.*, 2011, CURRÒ *et al.*, 2017).

Lerma-Garcia *et al.* (2010) utilizaram a espectroscopia no infravermelho para classificar o queijo Italiano Pecorino de acordo com sua técnica de fabricação e período de maturação. Foi considerado duas formas de fabricação (queijo fossa e nonfossa) e dois estágios de maturação (semi-duro e duro). Neste estudo como resultado foi obtido uma excelente resolução entre as bandas específicas e o modelo de análise discriminante linear, conseguindo-se assim classificar os queijos de acordo com suas características químicas próprias.

Burns e Ciurczak, (1992) utilizaram a espectroscopia com o objetivo de avaliar e classificar o período de maturação de diferente de queijos holandeses (Edam e Gouda), sendo assim conseguiram agrupar os grupos etários jovens (mínimo 28 dias), maturados jovens (mínimo 2 meses), maturados (mínimo 4 meses) e extra maturados (mínimo 7 meses).

Não se tem relatos na literatura sobre a utilização de espectroscopia no infravermelho no queijo minas artesanal do Serro, assim a utilização desta ferramenta representa um importante avanço na busca de uma metodologia analítica rápida, de baixo custo para avaliar aspectos de qualidade e identificação do período de maturação de queijo artesanal.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivos gerais

Esta pesquisa foi realizada com os objetivos de:

1. Avaliar a maturação do Queijo Minas Artesanal do Serro em relação à inibição do desenvolvimento de *Listeria monocytogenes* e,
2. Avaliar a aceitação sensorial do Queijo Minas Artesanal do Serro durante o período de maturação
3. Avaliar a espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (FTIR) como técnica capaz de prever o tempo de maturação e composição do fermento láctico natural do queijo artesanal.

3.2 Objetivos Específicos

Para atingir o objetivo de avaliar a maturação do queijo minas artesanal do Serro como fator de inibição do desenvolvimento de *Listeria monocytogenes*, realizou-se:

1. Avaliação da capacidade de crescimento, sobrevivência ou inativação de *L. monocytogenes*, inoculada experimentalmente, no Queijo Minas Artesanal do Serro durante o período de maturação (1, 4, 7, 12, 17 e 22 dias) armazenado nas temperaturas de 8°C e ambiente (~22°C);
2. Modelagem do crescimento, da sobrevivência ou inativação de *L. monocytogenes* no queijo minas artesanal do Serro em função do tempo de maturação armazenado nas temperaturas de 8°C e ambiente (~22°C);
3. Avaliação das características físico-químicas: pH, umidade, resíduo mineral fixo, atividade de água, acidez, teor de cloreto de sódio, proteína total e percentual de lipídios durante o período de maturação (1, 4, 7, 12, 17 e 22 dias) do queijo minas artesanal do Serro armazenado nas temperaturas de 8°C e ambiente (~22°C);
4. Enumeração da população dos micro-organismos proteolíticos, bactérias lácticas, bolores e leveduras, *Staphylococcus* coagulase positiva e coliformes termotolerantes durante o período de maturação (1, 4, 7, 12, 17 e 22 dias) do queijo minas artesanal do Serro armazenado nas temperaturas de 8°C e ambiente (~22°C);

Para atingir o objetivo de avaliar a aceitação sensorial do queijo minas artesanal do Serro, realizou-se:

1. Avaliação da aceitação sensorial do queijo minas artesanal do Serro durante o período de maturação (3, 10, 17, 24 e 31 dias) armazenado nas temperaturas de 8°C e ambiente (~22°C);
2. Avaliação da aceitação sensorial do queijo minas artesanal do Serro durante o período de maturação (3, 10, 17, 24 e 31 dias), produzidos com fermentos lácticos naturais distintos, “pingo” e “rala”.
3. Avaliação da intenção de compra do queijo minas artesanal do Serro durante o período de maturação (3, 10, 17, 24 e 31 dias) armazenado nas temperaturas de 8 °C e ambiente (~22°C);
4. Avaliação das características físico-químicas: pH, umidade, resíduo mineral fixo, atividade de água, acidez, teor de cloreto de sódio durante o período de maturação (3, 10, 17, 24 e 31 dias) do queijo minas artesanal do Serro; produzidos com “pingo” e “rala” e maturados em temperatura de 8°C e ambiente (~22°C).

Para atingir o objetivo de avaliar a espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier e refletância total atenuada (FTIR- ATR) como uma técnica capaz de predizer o tempo de maturação do queijo artesanal com base nas características dos espectros gerados, realizou-se:

1. Predição do período de maturação do queijo artesanal do Serro por meio do FTIR-ATR durante o período de maturação (3, 10, 17, 24 e 31 dias) armazenado nas temperaturas de 8°C e ambiente (~22°C);
2. Discriminação dos queijos produzidos entre tipos distintos de fermento láctico natural: “pingo” e “rala” armazenados nas temperaturas de 8°C e ambiente (~22°C);

4. Referências:

- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS, ABNT. **NBR ISO 5492**: análise sensorial, vocabulário. Rio de Janeiro, 2014. Disponível em: <<http://www.abntcatalogo.com.br>>.
- ALEGRÍA, A. *et al.* Diversity and evolution of the microbial populations during manufacture and ripening of *Casín*, a traditional Spanish, starter-free cheese made from cow's milk. **International Journal of Food Microbiology**, v.136, n.1, p.44–51, 2009.
- BARANCELLI, G.V. *et al.* *Listeria monocytogenes*: ocorrência em produtos lácteos e suas implicações em saúde pública. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v.78, n.1, p.155-168, 2011.
- BERTOLINO, M. *et al.* Evolution of chemico- physical characteristics during manufacture and ripening of Castel magno PDO cheese in wintertime. **Food Chemistry**, v.129, p.1001-1011, 2011.
- BERESFORD, T.P. *et al.* Recent advances in cheese microbiology. **International Dairy Journal**, v.11, p.259-274, 2001.
- BLAQUEZ, C. G. *et al.* Prediction of moisture, fat and inorganic salts in processed cheese by near infrared reflectance spectroscopy and multivariate data analysis. **Journal of Near Infrared Spectroscopy**, v. 12, p. 149–157, 2004.
- BLAZQUEZ, C. G. *et al.* Modelling of sensory and instrumental texture parameters in processed cheese by near infrared reflectance spectroscopy. **Journal of Dairy Research**, v.73, p. 58–69, 2006.
- BONFATTI, V. *et al.* Mid-infrared spectroscopy prediction of fine milk composition and technological properties in Italian Simmental. **Journal of Dairy Science**, v. 99, n. 10, p. 8216–8221, 2016.
- BORELLI, B. M. *et al.* Enterotoxigenic *Staphylococcus* spp. and other microbial contaminants during production of Canastra cheese, Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 37, p. 545-550, 2006.
- BORGES, M.F. *et al.* Micro-organismos patogênicos e indicadores em queijo de coalho produzido no Estado do Ceará, Brasil. **Boletim do Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos**, v. 21, n. 1, p. 31-40, 2003.
- BORGES, M. F. *et al.* Perfil de contaminação por *Staphylococcus* e suas enterotoxinas e monitorização das condições de higiene em uma linha de produção de queijo de coalho. **Ciência Rural**, v. 38, n. 5, p. 1431-1438, 2007.
- BRANCO, M. A. de A.C. *et al.* Incidência de *Listeria monocytogenes* em queijo de coalho refrigerado produzido industrialmente. **Boletim do Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos**, v. 21, n. 2, p. 393-408, 2003.

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

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 57 de 15 de dezembro de 2011. **Estabelece critérios adicionais para elaboração de queijos artesanais**. Diário Oficial da União, Brasília, Seção 1, página 23.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 30 de 07 de agosto de 2013. **Dispõe sobre a comercialização de queijos artesanais elaborados com leite cru**. Brasília: Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, 2013.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução - RDC nº 12, de 2 de janeiro de 2001. **Regulamento técnico sobre os padrões microbiológicos para alimentos**. Brasília, 2001.

BRITTES, A.D. Fungos: o que são e qual a importância dos fungos. 2007. Disponível em: <<https://educacao.uol.com.br/disciplinas/ciencias/fungos-o-que-sao-e-qual-e-a-importancia-dos-fungos.htm>. Acesso em: <31 de junho de 2018>.

BRUMADO, E. C. C. **Impacto do tipo de fermento endógeno na qualidade e tempo de maturação de queijo minas artesanal produzido em propriedades cadastradas pelo IMA (Instituto Mineiro de Agropecuária) na região do Serro-MG**. 2016. 158 f. Tese (Doutorado Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos)- Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Minas Gerais. 07 out. 2016.

BRUNO, L. M.; CARVALHO, J. D. G. **Microbiota láctica de queijos artesanais**. Fortaleza: Embrapa Agroindústria Tropical, 2009. 30p.

BURNS, D. A.; CIURCZAK, E. W. **Handbook of near infrared analysis**. New York: Dekker, 1992.

CABEZAS, L. *et al.* Comparison of microflora, chemical and sensory characteristics of artisanal Manchego cheeses from two dairies. **Food Control**, v. 18, p. 11- 17, 2005.

CARDOSO, V. M. *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, n. 3, p. 743-749, 2013.

CARDOSO V. M. *et al.* The influence of seasons and ripening time on yeast communities of a traditional Brazilian cheese. **Food Research International**, v.69, p. 331–340, 2015.

CARO ,I. *et al.* Characterization of Oaxaca raw milk cheese microbiota with particular interest in *Lactobacillus* strains **Journal of Dairy Science** v. 96 n. 6, 2013.

CASTRO, R. D. **Queijo Minas artesanal fresco de produtores não cadastrados da mesorregião de Campo das Vertentes – MG: qualidade microbiológica e físico-química em**

diferentes épocas do ano. 2015. 126 f. Dissertação (mestrado) – Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 10 fev. 2015.

CARVALHO J.D.G.; VIOTTO W.H.; KUAYE A.Y. The quality of minas frescal cheese produced by different technological processes. **Food Control**, v. 18, p. 262–267, 2007.

CARVALHO, B. M, A. **Detecção de soro de queijo em leite por espectrofotometria no infravermelho médio**. Dissertação (mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos. Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Minas Gerais, 31 jul. 2007.

CHAMBERS, J.V. The microbiology of raw milk. In: **Dairy Microbiology Handbook**, 3rd edition. Robinson RK (ed.). New York: John Wiley and Sons, 2002, pp. 39–90.

CHAN, Y.C.; WIEDMANN, M. Physiology and genetics of *Listeria monocytogenes* survival and growth at cold temperatures. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 49, p. 237–253, 2009.

CHEN, L.; DANIEL, R. M.; COOLBEAR, T. Detection and impact of protease and lipase activities in milk and milk powder. **International Dairy Journal**, v.13, n.40, p.255-275, 2003.

CHEN, G. *et al.* Application of infrared microspectroscopy and multivariate analysis for monitoring the effect of adjunct cultures during Swiss cheese ripening. **Journal of Dairy Science**, v. 92, n. 8, p. 3575–3584, 2009.

CHIODA, T. P. *et al.* Inibição do crescimento de *Escherichia coli* isolada de queijo “Minas Frescal” por *Lactobacillus acidophilus*. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 37, n. 2, p. 583-585, 2007.

CHOI, K. H. *et al.* Cheese Microbial Risk Assessments. **Journal Animal Science**. v. 29, p. 307-314, 2016.

COATES, J. Interpretation of infrared spectra, a practical approach. In: Encyclopedia of Analytical Chemistry. R. A. Meyers, ed. John Wiley Sons, Chichester, UK. 2000.

CURRÒ, S. *et al.* Technical note: Feasibility of near infrared transmittance spectroscopy to predict cheese ripeness. **Journal of Dairy Science**, v. 100, n. 11, 2017.

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. Conjuntura mensal especial: Leite e derivados. Brasília, 2017.

DOMINGOS, E. *et al.* Melamine detection in milk using vibrational spectroscopy and chemometrics analysis: A review. **Food Research International**, v. 60, p. 131–139, 2014.

DONNELLY, C. W. *Listeria monocytogenes*: a continuing challenge. **Nutrition Reviews**, v. 59, p.183-194, 2001.

DONNELLY C. W. Growth and survival of microbial pathogens in cheese. **In Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology**. Londres: Elsevier Academic Press, 2005. v.1, p 541–559.

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

DORES, M. T. das; NOBREGA, J. E., FERREIRA, C. L. L. F. Room temperature aging to guarantee microbiological safety of brazilian artisan Canastra cheese. **Food Science Technology**, v. 33, n.1, p. 180-185, 2013.

DRAKE, M. A. Invited review: sensory analysis of dairy foods. **Journal of Dairy Science**, v.90, n. 49, p.25-37, 2007.

EMATER. EMPRESA DE ASSISTÊNCIA TÉCNICA E EXTENSÃO RURAL DO ESTADO DE MINAS GERAIS. As Regiões Queijeiras de Minas Gerais. 16 out. 2016. Disponível em: <https://www.chicoseverino.com/single-post/2017/04/26/Blog-5-Elementos---As-Regi%C3%B5es-Queijeiras-de-Minas-Gerais>>. Acesso em: < 10/05/2018>.

FAVA, L. W. et al. Characteristics of Colonial Hand-Made Cheeses Sold in an Agricultural Show. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 40 n. 4 p. 1-6, 2012.

FARIA, E. V.; YOTSUYANAGI, K. Técnicas de análise sensorial. 2. ed. Campinas: ITAL, 120 p. 2008.

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION (FDA). Quantitative assessment of relative risk to public health from foodborne. *Listeria* among selected categories of ready-to-eat foods. 2003. Disponível em: < <https://www.fda.gov/downloads/food/foodscienceresearch/ucm197330.pdf>>. Acesso em: 25 out. 2017.

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION (FDA). Joint FDA/Health Canada quantitative assessment of risk of Listeriosis from soft-ripened chesse consumption in the United States and Canada: draft interpretative summary. 2012. Disponível em: < <https://www.fda.gov/Food/FoodScienceResearch/RiskSafetyAssessment/ucm429410.htm>> Acesso em: 25 out. 2017.

FEITOSA, T. *et al* . Pesquisa de *Salmonella* sp., *Listeria* sp. e micro-organismos indicadores higiênico-sanitários em queijos produzidos no estado do Rio Grande do Norte. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.23, p.162-165, 2003.

FIGUEIREDO, S. P. Características do leite cru e do queijo minas artesanal produzidos na região do serro, minas gerais e, produção de queijos com doces. Dissertação de Mestrado. Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri. Diamantina, 2014.

FLÓREZ, A.B.; HERNÁNDEZ-BARRANCO, A.M.; BALTASAR MAYO, I.M. Biochemical and microbiological characterization of artisan kid rennet extracts used for Cabrales cheese manufacture. **LWT - Food Science and Technology**, v.39, p.605-612, 2006.

FRANCO, B. D. G. M., LANDGRAF, M. Microbiologia dos alimentos. **Micro-organismos patogênicos de importância em alimentos**. Editora Atheneu. São Paulo. 2003.

GALÁN, E. *et al.* Proteolysis, microbiology and sensory properties of ewes' milk cheese produced with plant coagulant from cardoon *Cynara cardunculus*, calf rennet or a mixture thereof. **International Dairy Journal**, v.25, p.92-96, 2012.

GONZÁLEZ-MARTÍN, M. I. *et al.* Prediction of sensory attributes of cheese by near-infrared spectroscopy. **Food Chemistry**, v. 127, n. 1, p. 256–263, 2011

GUNDOGAN, N.; EBRU AVCI. Occurrence and antibiotic resistance of *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* and *Bacillus cereus* in raw milk and dairy products in Turkey. **International Journal of Dairy Technology**. v.67, n.4, 2014.

HEQUET, A.; LAFFITTE, V.; SIMON, L.; DE SOUZA-CAETANO, D.; THOMAS, C.; FREMAUX, C.; BERJEAUD, J.M. Characterization of new bacteriocinogenic lactic acid bacteria isolated using a medium designed to simulate inhibition of *Listeria* by *Lactobacillus sakei* 2512 on meat. **International Journal of Food Microbiology** v. 113. p. 67-74, 2007.

IMA – INSTITUTO MINEIRO DE AGROPECUÁRIA. **Identifica a Região do triângulo Mineiro é reconhecida como produtora de Queijo Minas Artesanal**. 2013.

INSTITUTO MINEIRO DE AGROPECUÁRIA. Portaria nº 1397, de 13 de fevereiro de 2014. Identifica a Região do triângulo Mineiro como produtora de Queijo Minas Artesanal. 2014.

IMA – INSTITUTO MINEIRO DE AGROPECUÁRIA. Portaria nº 1022, de 03 de novembro de 2009. Identifica a Região do Campo das Vertentes como produtora de Queijo Minas Artesanal. 2009.

IMA- INSTITUTO MINEIRO DE AGROPECUÁRIA. Queijo minas artesanal. Detalhes de Produtores de queijo minas artesanal. *on-line*, 11 maio2018. Disponível em: <http://www.ima.mg.gov.br/material-curso-cfo-cfoc/doc_details/680-produtores-queijo-minas-artesanal>. Acesso em: 29/04/2018.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. IBGE cidades. Disponível em: <<https://cidades.ibge.gov.br/brasil/mg/serro/panorama>>. Acesso em 14/03/2018.

IPHAN. Instituto do Patrimônio Histórico e Artístico Nacional. **Dossiê IPHAN 11: Modo artesanal de fazer queijo de Minas: Serro, Serra da Canastra e Serra do Salitre /Alto Paranaíba**. In: Os territórios do queijo artesanal de Minas (O território do queijo do Serro) – Brasília, Distrito Federal, 2014.

JAKOBSEN, R. A. *et al.* *Staphylococcus aureus* and *Listeria monocytogenes* in Norwegian raw milk cheese Production. **Food Microbiology**, v.28, n.3, p.492-496, 2011.

JAY, J.M.; LOESSNER, M., GOLDEN, D.A. **Modern Food Microbiology** 7th Edition, Springer, New York, NY, USA, 790 p., 2005.

JOHNSON, M. E. Cheese products. In: Applied dairy microbiology, 2º ed (Eds. E. H. Marth and J.L. Steele). Marcel Dekker, Inc., New York, NY, USA. P. 345-384, 2001.

- KAROUI, R., E. *et al.* Fluorescence and infrared spectroscopies: A tool for the determination of the geographic origin of Emmental cheeses manufactured during summer. **Lait**, v. 84, p. 359-365, 2004
- KAROUI, R., E. *et al.* The potential of combined infrared and fluorescence spectroscopies as a method of determination of the geographic origin of Emmental cheeses. **International Dairy Journal**, v. 15, p. 287–298, 2005.
- KOBAYASHI, P.F. *et al.* Detection of *Brucella* spp., *Campylobacter* spp. and *Listeria monocytogenes* in raw milk and cheese of uninspected production in the metropolitan area of São Paulo. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 38, n. 4, p. 1897-1904, 2017.
- KONGO, J.M. *et al.* Microbiological, biochemical and compositional changes during ripening of São Jorge - a raw milk cheese from the Azores (Portugal). **Food Chemistry**, v.112, n.1, p.131-138, 2009. KRAGGERUD, H.; NAES, T.; ABRAHAMSEN, R. K.; Prediction of sensory quality of cheese during ripening from chemical and spectroscopy measurements. **International Dairy Journal**, v. 34, p.6-18, 2014.
- KRAGGERUD, H.; NAES, T.; ABRAHAMSEN, R. K.; Prediction of sensory quality of cheese during ripening from chemical and spectroscopy measurements. **International Dairy Journal**, v. 34, p.6-18, 2014.
- LAVASANI, A. R. S. *et al.* Changes in physicochemical and organoleptic properties of traditional Iranian cheese Lighvan during ripening. **International Journal of Dairy Technology**, v.65, n.1, p.64-70, 2011.
- LERMA-GARCÍA, J. M. *et al.* Classification of pecorino cheeses produced in Italy according to their ripening time and manufacturing technique using Fourier transform infrared spectroscopy. **American Dairy Science Association**, 2010.
- LIMA, C.D.L.C. *et al.* Bactérias do ácido láctico e leveduras associadas com o queijo-de-minas artesanal produzido na região da Serra do Salitre, Minas Gerais. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 61, n.1, p. 266-272, 2009.
- LOGUERCIO, A. P.; ALEIXO, J. A. G.. Microbiologia de queijo tipo Minas frescal produzido artesanalmente. **Ciência Rural**, v. 31, n. 6, p. 1063-1067. 2001
- MANOLOPOULOU, E. *et al.* Evolution of microbial populations during traditional Feta cheese manufacture and ripening. **International Journal of Food Microbiology**, v.82, p.153-161, 2003.
- MARCY, J. A. e PRUETT, P. J. Proteolytic microorganisms. In: MARCY, J. A. e PRUETT, P. J. *Microbiological Examination of foods*. American Public Health Association, Washington, 2001. cap.16.
- MARINHO, M. T. *et al.* Antioxidant effect of dehydrated rosemary leaves in ripened semi-hard cheese: A study using coupled TG–DSC–FTIR (EGA). **LWT - Food Science and Technology**, v. 63, n. 2, p. 1023–1028, 2015.
- MARTINS, J.M. Características físico-químicas e microbiológicas durante a maturação do queijo minas artesanal da região do Serro. 2006. 158p. **Tese** (Doutorado, Programa de Pós-

graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Universidade Federal de Viçosa. Viçosa, MG, 2006.

MARTINS, J. M et al., Determining the minimum ripening time of artisanal Minas cheese, a traditional Brazilian cheese. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 46, n. 1, p. 219-230, 2015.

MCSWEENEY, P. L. H. *Biochemistry of Cheese Ripening*, Elsevier. P. 667-674, 2011

MAZEROLLES, G. *et al.* Détermination des taux d'humidité et de matière grasse des fromages de type pâte pressée par spectroscopie proche infrarouge en mode transmission. **Le Lait**, v. 80, p. 371-379, 2000.

MELLEFONT, L.A.; ROSS, T. Effect of Potassium Lactate and a Potassium Lactate- Sodium Diacetate Blend on *Listeria monocytogenes* Growth in Modified Atmosphere Package Sliced Ham. **Journal of Food Protection** v.70, n. 10 p. 2297-2305, 2007.

MELO, F. D. DALMINA, K. A. PEREIRA, M. N. RAMELLA, M. V. NETO, A. T. VAZ, E. K. E FERRAZ, S. M. Evaluation of the Safety and Quality of Microbiological Handmade Cheese Serrano and its Relation to Physical and Chemical Variables the Period of Maturity. *Acta Scientiae Veterinariae*. n. 41, p.1152, 2013.

MELVILLE, P. A. *et al.* Ocorrência de fungos em leite cru proveniente de tanques de refrigeração e latões de propriedades leiteiras, bem como de leite comercializado diretamente ao consumidor. **Arquivo Instituto de Biologia**, v. 73, n. 3, p.295-301, 2006.

MENESES, J.N.C. Queijo Artesanal de Minas: patrimônio cultural do Brasil. Vol. 1 Ministério da Cultura, Instituto do Patrimônio Histórico e Artístico Nacional (Dossiê interpretativo), 2006.

MILKPOINT, 2017. MG: produção de queijo minas artesanal ganha reforço com o atendimento de produtores familiares. Disponível em: <https://www.milkpoint.com.br/industria/cadeia-do-leite/giro-de-noticias/mg-producao-de-queijo-minasartesanal-ganha-reforco-com-o-atendimento-de-produtores-familiares-104224n.aspx>. Acesso em : <28 jan. 2018>.

MILKPOINT. Abiq: mercado de queijos tem alto potencial de crescimento no Brasil, 2017. Disponível em: < <https://www.milkpoint.com.br/noticias-e-mercado/giro-noticias/abiq-mercado-de-queijos-tem-alto-potencial-de-crescimento-no-brasil-105515n.aspx>>. Acesso em: <31/05/2018>.

MINAS GERAIS. ASSEMBLÉIA LEGISLATIVA DO ESTADO DE MINAS GERAIS. Decreto nº 42.645, de 05 de junho de 2002. Aprova o regulamento da Lei nº 14.185, de 31/01/2002, que dispõe sobre o processo de produção de queijo Minas artesanal. Diário do Executivo. Minas Gerais, Belo Horizonte, 6 jun. 2002

MINAS GERAIS. Instituto Mineiro de Agropecuária. Portaria 1305, de 30 de abril de 2013. Estabelece diretrizes para produção do Queijo Minas Artesanal. Belo Horizonte, 2013.

MINISTERIO DA SAÚDE. Surtos de Doenças Transmitidas por Alimentos no Brasil. Disponível em: <<http://portal.arquivos.saude.gov.br/images/pdf/2017/maio/29/Apresentacao-Surtos-DTA-2017.pdf>>. Acesso em: <02/06/2018>.

MORAES, P. M. G. N. *et al.* Foodborne Pathogens and Microbiological Characteristics of Raw Milk Soft Cheese Produced and on Retail Sale in Brazil. **Foodborne Pathogens and Disease**, v. 6, n. 2, p.245-249, 2009.

MORANDI, S. *et al.* Antimicrobial activity, antibiotic resistance and safety of lactic acid bacteria in raw milk Valtellina Casera Cheese. **Journal of Food Safety**. v. 35, n. 2, p. 193-205, 2015.

MOREIRA, N. V. MONTANHINI, M. T. M. Contaminação do leite na ordenha por micro-organismos proteolíticos e lipolíticos. **Revista Brasileira de Higiene e Sanidade Animal**. v.8, n.2 p. 29 – 38, 2014.

MURPHY, R.Y. Considerations for post-lethality treatments to reduce *Listeria monocytogenes* from fully cooked bologna using ambient and pressurized steam **Food Microbiology** v.22 p. 359-365, 2005.

NOBREGA, J. E. da. **Biodiversidade microbiana, descritores físico-químicos e sensoriais dos queijos artesanais fabricados nas regiões da Serra da Canastra e do Serro, Minas Gerais**. 2012. 127p. Tese de doutorado em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Minas Gerais. 2012.

NORNBERG, M.F.B.L. *et al.* Proteolytic activity among psychrotrophic bacteria isolated from refrigerated raw milk. **International Journal of Dairy Technology**, v.63, n.1, p. 41-46, 2010.

ORTOLANI M.B.T. *et al.* Microbiological quality and safety of raw milk and soft cheese and detection of autochthonous lactic acid bacteria with antagonistic activity against *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* spp., and *Staphylococcus aureus*. **Foodborne Pathogens and Diseases** n. 7 v.2 p.175-180, 2010.

ORVALHO, R. J. S. **Redução do teor de sódio em fiambre: implicações tecnológicas, organolépticas e de prazo de validade**. 2010. 106 p. Dissertação (Mestrado Integrado em Medicina Veterinária) - Universidade Técnica de Lisboa, Lisboa, 2010.

PERIN, L.M. Microbiota of Minas cheese as influenced by the nisin producer *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* GLc05. **International Journal of Food Microbiology**, v. 214, p. 159-167, 2015.

PERIN, L.M. *et al.* Bacterial ecology of artisanal Minas cheeses assessed by culture-dependent and independent methods. **Food Microbiology**. v. 65, p. 160-169, 2017.

PICON, A. *et al.* Microbiota dynamics and lactic acid bacteria biodiversity in raw goat milk cheeses. **International Dairy Journal**, v. 58, p. 14-22, 2016.

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

PINTO, M. S. *et al.* Survival of *Listeria innocua* in Minas Traditional Serro cheese during ripening. **Food Control**, v. 20, p. 1167–1170, 2009.

PINTO, C. L. O. *et al.* Identificação de bactérias psicrotróficas proteolíticas isoladas de leite cru refrigerado e caracterização do seu potencial deteriorador. **Revista Instituto Laticínios Cândido Tostes**, v. 70, n. 2, p. 105-116, 2015

PERRY, K.S.P. Cheese: chemical, biochemical and microbiological aspects. **Química Nova**, v. 27, n. 2, p.293-300, 2004.

PORTAL DO QUEIJO. O crescimento do Mercado de queijos no Brasil. 2016. Disponível em: <<http://portaldoqueijo.com.br/noticias/2016/11/11/crescimento-do-mercado-de-queijos-no-brasil>>. Acesso em: <10 de outubro de 2017>.

RESENDE, M. F. S. *et al.* Queijo-de-minas artesanal da Serra da Canastra: influência da altitude das queijarias nas populações de bactérias ácido-lácticas. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.63, n.6, p.1532-1538, 2011.

REZENDE, P. H. L. *et al.* Aspectos sanitários do queijo Minas artesanal comercializado em feiras-livres. **Revista Instituto Laticínios. Cândido Tostes**. v.65, n.377, p.36-42, 2010.

RILEY, M. A.; WERTZ, J. E. Bacteriocins: evolution, ecology, and application. **Annual Review of Microbiology**. v. 56, p. 117-137, 2002.

RODRÍGUEZ-LÁZARO, D.; COOK, N.; HERNANDEZ, M. Real-time PCR methods for the detection of *Listeria monocytogenes* in foods. In: Rodríguez-Lázaro, D. Real-time PCR in Food Science: **Current Technology and Applications**. Ed. Horizon Scientific Press, Norfolk, UK, p. 9-90, 2013.

RODRIGUEZ-SAONA, L. E., N. *et al.* Rapid determination of Swiss cheese composition by Fourier transform infrared/attenuated total reflectance spectroscopy. **Journal Dairy Science**, v. 89, p.1407–1412, 2006.

SANGALETTI N. *et al.* Estudo da vida útil de queijo Minas. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 29, n.2, p. 262-269, 2009.

SANTANA, E.H.W.*et al.* Contaminação do leite em diferentes pontos do processo de produção: I. Micro-organismos aeróbios mesófilos e psicrotróficos. **Semina Ciências Agrárias**, v.22, n.2, p.145-154, 2001.

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

SKANDAMIS, P.N. *et al.* Heat and acid tolerance of *Listeria monocytogenes* after exposure to single and multiple sublethal stresses. **Food Microbiology**, v. 25, p. 294-303, 2008.

SCHVARTZMAN, M.S. *t al.* Modelling the fate of *Listeria monocytogenes* during manufacture and ripening of smeared cheese made with pasteurised or raw milk. **International Journal of Food Microbiology**, v.145, p31–38, 2011.

SILVA, N. *et al.*, **Manual de Métodos de Análise Microbiologia de Alimentos e Água**. Varela, 4ª ed, 2010.

SILVA, F.; SILVA, G. **Análise microbiológica e físico-química de queijos coloniais com e sem inspeção, comercializados na microrregião de Francisco Beltrão-PR**. 2013. 59f. Trabalho (conclusão de curso). Curso Superior de Tecnologia de Alimentos. Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Francisco Beltrão, PR.

SILVA, M. C. D. *et al.* . Influência dos procedimentos de fabricação nas características físico-químicas, sensoriais e microbiológicas de queijo de coalho. **Revista Instituto Adolfo Lutz**, v.69, n.2, p.214-21, 2010.

SOUZA, R. A. *et al.* Incidência de *Listeria monocytogenes* em queijo de coalho artesanal, comercializado á temperatura ambiente, em Fortaleza, **Higiene alimentar**, v. 20, n. 138, p. 66-69, 2006.

TORRES, A. B. N. *et al.* Análise sensorial e físico-química do vinho de caju (*Anacardium occidentale*). In: ENCONTRO LATINO AMERICANO DE INICIAÇÃO CIENTIFICA, 8., 2004, São José dos Campos. **Anais...** São José dos Campos: UNIVAP, 2004.

VIANA, F. R OLIVEIRA, A. L.; CARMO, L. S., ROSA C. A. Occurrence of coagulase-positive *Staphylococci*, microbial indicators and physical–chemical characteristics of traditional semihard cheese produced in Brazil. **Journal of Dairy Technology**. v. 62, n.3. 2009.

VINHA, M. B. *et al.* Fatores socioeconômicos da produção de queijo minas frescal em agroindústrias familiares de Viçosa, MG. **Ciência Rural**, v. 40, n. 9, p. 2023-2029, 2010.

ZAFFARI, C. B. MELLO, J. F. COSTA, M. Qualidade Bacteriológica de queijos artesanais comercializados em estradas do litoral norte do Rio Grande do Sul, Brasil. **Ciência Rural**, v.37 n. 3, p. 362-367, 2007.

ZIELINSKI, A. A. F.; HAMINIUK, C. W. I.; NUNES, C. A.; SCHNITZLER, E.; VAN RUTH, S. M.; GRANATO, D. Chemical Composition, Sensory Properties, Provenance, and Bioactivity of Fruit Juices as Assessed by Chemometrics: A Critical Review and Guideline. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 13, n. 3, p. 300–316, 2014. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1111/1541-4337.12060>>. Acesso em: <16 de outubro de 2017>.

ZOCCAL, R. Queijos: produção e importação. Revista Balde Branco, 17 de agosto de 2016. Disponível em: <http://www.baldebranco.com.br/queijos-producao-e-importacao>>. Acesso em: <15 de outubro de 2017>.

WARRINER, K.; NAMVAR, A. What is the hysteria with *Listeria*? **Trends in food science & Technology**, v.20, p. 245–254, 2009.

WILLIAMS, A.G. WITHER, S. E. Microbiological characterisation of artisanal farmhouse cheeses manufactured in Scotland. **International Journal of Dairy Technology**, v. 63, n. 3, 2010.

Capítulo 1

Comportamento de *Listeria monocytogenes* durante a maturação do Queijo Minas Artesanal do Serro

Resumo

O objetivo desta pesquisa foi avaliar o comportamento de *Listeria monocytogenes* ao longo do processo de maturação, nas condições de ambiente e de temperatura controlada (8°C), do queijo Minas artesanal do Serro, modelando o crescimento em função do tempo e condições de maturação. Além da *L. monocytogenes* inoculada, foram enumeradas as populações de coliformes termotolerantes, *Staphylococcus* coagulase positiva, fungos filamentosos e leveduras, bactérias ácido-láticas e micro-organismos proteolíticos. As análises físico-químicas realizadas foram acidez, pH, atividade de água, teor de cloreto de sódio, umidade, teor de gordura no extrato seco e proteína total. O comportamento de *L. monocytogenes* durante a maturação foi distinto entre as temperaturas de maturação. A *L. monocytogenes* foi mais resistente às transformações ocorridas nos queijos na maturação em temperatura controlada, o que não se observou na maturação a temperatura ambiente. Nos queijos maturados a temperatura ambiente, *L. monocytogenes* não foi mais detectada a partir do 7º dia de maturação. A taxa de inativação de *L. monocytogenes* foi similar para as temperaturas avaliadas. Contudo, na maturação a temperatura controlada, observou-se uma população residual de 1,13 a 1,27 log UFC/g após 22 dias. *Staphylococcus* coagulase positiva, apesar de apresentar redução nas contagens ao longo da maturação, foi mais sensível quando maturado a vácuo sob refrigeração, persistindo com população acima de 3 log UFC/g em todas as condições de maturação. Coliformes termotolerantes, apresentaram contagens médias de 2 log UFC/g ao final dos 22 dias. As contagens das BALs ficaram situadas na faixa de 7 log UFC/g. Fungos e micro-organismos proteolíticos apresentaram contagens médias de 6 log UFC/g. Nesse estudo, observou-se que ao final dos 17 dias de maturação, em relação a *L. monocytogenes* o queijo estava próprio para consumo quando maturação na condição ambiente e impróprio quando maturado sob refrigeração à 8°C. A condição de maturação pode ser um parâmetro fundamental para garantia da segurança do queijo minas artesanal do Serro, considerando o período mínimo de 17 dias preconizado pela legislação estadual. A variação nos parâmetros físico-químicos ao longo da maturação influenciou mais significativamente o comportamento da *L. monocytogenes* do que os outros grupos de micro-organismos, especificamente a umidade e a atividade de água. A variação na população de

micro-organismos não teve fortemente correlação com as variações observadas nos parâmetros físico-químicos avaliados.

Palavras-chave: *Listeria monocytogenes*. Predição. Maturação. Leite cru. Queijo Artesanal.

Behavior of *Listeria monocytogenes* during the ripening of artisanal Minas cheese of the Serro region.

Abstract

The aim of this research was to evaluate the behavior of *Listeria monocytogenes* over the ripening process both on ambient conditions and controlled temperature (8°C) on Artisanal Minas Cheese from Serro, modeling growth as a function of time and ripening conditions. Besides inoculated *L. monocytogenes*, the populations of thermotolerant coliforms, coagulase positive *Staphylococcus*, filamentous fungi and yeasts, acid-lactic bacteria (BAL) and proteolytic microorganisms were also enumerated. The physical-chemical analyzes were acidity, pH, water activity, sodium chloride content, moisture, fat content in dry extract and total protein. The behavior of *L. monocytogenes* during the maturation was distinct between the ripening temperatures. *L. monocytogenes* was more resistant to the transformations that occurred on cheeses ripened at controlled temperature, which wasn't seen in ripening in ambient temperature. In cheeses ripened at ambient temperature *L. monocytogenes* was no longer detected from the 7th ripening day. The inactivation rate of *L. monocytogenes* was similar for both assessed temperatures. However, on ripening at controlled temperature, a residual population of 1,13 to 1,27 log UFC/g after 22 days was observed. Regarding coagulase positive *Staphylococcus*, although presenting a reduction in countings over ripening, it was more sensitive when ripened at vacuum under refrigeration, persisting with a population above 3 log UFC/g in all ripening conditions. Thermotolerant coliforms presented average countings of 2 log UFC/g at the end of the 22 days. The countings of BAL were situated around 7 log UFC/g. Fungi and proteolytic microorganisms presented average countings of 6 log UFC/g. In this study it was observed that, regarding *L. monocytogenes*, at the end of the 17 maturation days, the cheese was proper for consumption when ripened on ambient conditions, but improper when ripened under refrigeration at 8°C. The ripening condition can be a fundamental parameter for assuring the safety of artisanal minas cheese from Serro, considering the minimum period of 17 days recommended by state's legislation. The variation of physical-chemical parameters over the ripening influenced more significantly the behavior of *L. monocytogenes* than the other microorganisms groups, specifically the moisture and water activity. The variation on microorganisms population wasn't strongly correlated with the observed variations on the assessed physical-chemical parameters.

Palavras-chave: *Listeria monocytogenes*. Prediction. Ripening. Raw Milk. Artisanal Cheese

1. Introdução:

Listeria monocytogenes é uma bactéria patogênica frequentemente encontrada em produtos prontos para o consumo (SIP *et al.*, 2012). Listeriose é uma doença potencialmente letal, com taxa de mortalidade em torno de 30% (FAO, 2004). A incidência de listeriose é muito maior em indivíduos suscetíveis, incluindo mulheres grávidas, idosos e indivíduos com o sistema imunológico comprometido (BUCHANAN *et al.*, 2017). O patógeno é largamente difundido na natureza sendo encontrado no solo, silagem, água e, dessa forma, pode facilmente contaminar alimentos de origem animal, como carne e produtos lácteos (LAMBERTZ *et al.*, 2012). As estirpes de *L. monocytogenes* são capazes de sobreviver e crescer em diversas condições ambientais, como alta concentração de sal, temperaturas elevadas e de refrigeração, pH baixo, baixa umidade, podendo representar potencial perigo nos alimentos (RYSER, 2007, BUCHANAN *et al.*, 2017).

Com a intenção de avaliar o comportamento de *L. monocytogenes*, vários estudos têm sido realizados inoculando, intencionalmente, este patógeno aos queijos. Em alguns durante o processo de maturação, *L. monocytogenes* tornou-se incapaz de crescer no queijo (ANGELIDIS, BOUTSIOUKI e PAPAGEORGIOU, 2010; ORTENZI *et al.*, 2015), já em outros conseguiu sobreviver a períodos maiores que 60 dias (D'AMICO *et al.*, 2008; DURMAZ, 2009 SCHVARTZMAN *et al.*, 2011, TIWARI *et al.*, 2014; VALERO *et al.*, 2014, COSCIANI e CUNICO *et al.*, 2015; BELLIO *et al.*, 2016).

No Brasil, o Queijo Minas Artesanal (QMA) é um dos queijos mais populares e antigos produzidos no país, com destaque para o queijo minas artesanal do Serro, produzido na região do Serro no estado de Minas Gerais (PINTO *et al.*, 2009; DORES e FERREIRA 2012; MARTINS *et al.*, 2015).

A produção do QMA do Serro, a partir de leite cru, constitui meio adequado a multiplicação de bactérias patogênicas, como *L. monocytogenes* (ZAFFARI; MELLO e COSTA, 2007). Esse agente patogênico pode estar presente no leite cru e, permanecer ativo após a produção do queijo, já que o leite utilizado não passa por tratamento térmico (VERRAES *et al.*, 2015). Representando, portanto, uma preocupação de saúde para os consumidores (VALERO *et al.*, 2014).

A legislação federal (BRASIL, 2017) permite a comercialização de queijos de leite cru desde que sejam submetidos a um processo de maturação por um mínimo de 60 dias a uma temperatura superior a 5 °C. Contudo, esse mesmo Decreto flexibiliza o período mínimo de

maturação desde que existam estudos científicos conclusivos sobre a inocuidade do produto. Nesse sentido, o Instituto Mineiro de Agropecuária, por meio da Portaria nº 1305, de 30 de abril de 2013, estabeleceu o período mínimo de maturação do QMA do Serro em 17 dias quando à temperatura ambiente. Ressalta-se que esse período mínimo foi definido com base em poucos estudos científicos e que não levaram em consideração o comportamento dos micro-organismos, mas simplesmente a sua detecção. Além disso, não define o período de maturação para condições outras que a ambiente (MINAS GERAIS, 2013).

Apesar do conhecimento, ampla produção e consumo de queijo minas artesanal e da detecção de diferentes tipos de micro-organismos indicadores e patogênicos, até o presente momento não existem estudos sobre o comportamento da população de *L. monocytogenes* em queijo minas artesanal do Serro. Também há uma escassez de dados no que se refere ao período mínimo de maturação para garantir a inocuidade do queijo em relação a bactérias patogênicas.

Diante do exposto o objetivo do trabalho é avaliar o comportamento de *Listeria monocytogenes* ao longo do processo de maturação do queijo Minas artesanal do Serro, modelando o crescimento e sobrevivência em função das características físico-químicas e da diversidade microbiana apresentada pelo queijo.

2. Metodologia:

2.1 Amostras de queijo:

Foram analisadas amostras de dois produtores de queijos artesanais da microrregião do Serro, Minas Gerais, cadastrados no Instituto Mineiro de Agropecuária (IMA). As coletas consistiram em duas amostras controles e duas amostras contaminadas com *L. monocytogenes*. O experimento foi realizado com repetição. Nas propriedades rurais foram coletadas, em sacos plásticos estéreis, as massas ou coalhadas dos queijos obtidas antes da enformagem do queijo. Após a coleta, externamente à propriedade rural, foi realizada a inoculação de *L. monocytogenes* na massa do queijo, sendo esta transportada em caixa isotérmica até o laboratório de Higiene dos Alimentos da Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri onde as massas dos queijos foram enformadas e salgadas de acordo com a quantidade usual de sal grosso utilizado pelos produtores de queijo do Serro, consistindo na primeira salga. Depois de 12 horas foi efetuada a viragem do queijo e a segunda salga, seguida da terceira salga e viragem dos queijos. Após 48 horas os queijos foram retirados das formas e armazenados a 8° C e a temperatura ambiente (média de 22° C).

Os queijos a 8° C foram embalados utilizando as embalagens do tipo a vácuo em filme plástico flexível termo encolhível próprias de comercialização, em seguida foram seladas a vácuo e acondicionado em estufa tipo BOD. Os queijos a temperatura ambiente foram maturados, sem embalagens e em prateleiras de madeira. A temperatura ambiente foi monitorada através de registradores de temperatura tipo *datalogger* efetuadas a cada hora.

2.2 Preparação do inóculo de *Listeria monocytogenes*

Cinco cepas de *L. monocytogenes* (1/2 a, 1/2 b 4 a, 4 b, Scott A), da coleção biológica da Fundação Oswaldo Cruz, foram ativadas em 3 ml de *Tryptic Soy Broth* (TSB, Himedia, Índia) suplementado com 0,6% de extrato de levedura. Aliquotas de 0,2 ml de cada cultivo/cepa foram transferidas para tubos contendo 9 ml de solução de NaCl à 0,9% até atingir a turbidez equivalente a 0,5 pontos (10^8 UFC/ml) na escala de *McFarland*. Foi inoculada solução de NaCl contendo 2×10^8 UFC/ml na massa do queijo antes da enformagem do queijo. Essa densidade populacional elevada foi empregada com o intuito de avaliar o decréscimo do crescimento de *Listeria monocytogenes* ao longo do período de maturação.

2.3 Enumeração da população de *Listeria monocytogenes*

Uma alíquota de 25 g de cada amostra foi adicionada à 225 mL de solução salina, homogeneizada por 2 minutos utilizando homogeneizador tipo “stomacher”. Em seguida, foram plaqueadas em superfícies de ágar Palcam (Acumedia, Neogen, USA) e ágar Oxford (Acumedia, Neogen, USA) e incubadas a 35°C por 24 horas. Colônias típicas de *L. monocytogenes* foram contadas e cinco foram selecionadas e submetidas à identificação bioquímica, por meio dos testes de produção de catalase, fermentação de carboidratos (xilose, ramnose), hemólise em ágar sangue de equino e motilidade a 25° C. Os resultados foram expressos como Unidade Formadora de Colônia de *L.monocytogenes* por grama de queijo. As análises de enumeração da população de *L monocytogenes* foram realizadas nos tempos 0, 1, 2, 4, 7, 12, 17, 22 dias de maturação sendo o queijo estocado a 8° C e a temperatura ambiente.

2.4 Detecção de *Listeria monocytogenes* em amostra controle (sem inoculação)

Uma alíquota de 25 g de cada amostra foi adicionada à 225 mL de caldo Demi-Fraser com suplemento (Difco™) e incubadas a 35°C por 24 h. Em seguida, alíquotas foram

semeadas por esgotamento em placas com Ágar Palcam (Acumedia, Neogen, USA) e Oxford (Acumedia, Neogen, USA). Colônias típicas de *L. monocytogenes* foram submetidas à identificação bioquímica, por meio dos testes de produção de catalase, fermentação de carboidratos (xilose, ramnose). Os resultados foram expressos como ausência/presença de *L. monocytogenes* em 25 g de queijo.

2.5 Análise microbiológica do queijo

As amostras de queijo foram analisadas nos tempos 1, 4, 7, 12, 17, 22 dias de maturação. A determinação dos micro-organismos proteolíticos foi realizada de acordo com a metodologia do *Guidelines from the Standard Methods for the Examination Dairy Products*. O preparo do meio constituiu em adicionar leite em pó desnatado reconstituído e esterilizado na proporção 10 % peso/peso ao *Standard Methods Agar* (SMA), as placas foram incubadas a 35° C por 48 a 72 horas. Para leitura das colônias características foi adicionado ácido acético 10% às placas por 1 minuto. Posteriormente, foi realizada a enumeração das colônias rodeadas por zonas claras. Bolores e leveduras foram determinados através do ágar *Dicloran Rosa Bengala Cloranfenicol* (DRBC). As placas foram incubadas a 25° C por até 5 dias. Bactérias lácticas foram enumeradas por meio da semeadura de alíquotas das amostras em profundidade, com adição de sobrecamada do *Ágar de Man Rogosa & Sharpe* (MRS), com incubação a 35° C por 48 a 72 horas. Para confirmação das bactérias lácticas, cinco colônias características foram submetidas ao teste de catalase utilizando peróxido de hidrogênio. A contagem de coliformes termotolerantes foi realizada por meio da técnica do Número Mais Provável (NMP) utilizando tubos de Caldo Lauril Triptose incubados a 35 °C por 24 horas e, em seguida tubos de caldo EC incubados em banho-maria a 45° C por 24 horas. Os resultados foram expressos em Número Mais Provável (NMP) por grama de queijo. *Staphylococcus* coagulase positiva foram enumerados utilizando Ágar Baird Parker adicionado de emulsão de gema de ovo e telurito. As placas foram incubadas a 35 ° C por 48 horas. Cinco colônias características de *Staphylococcus* foram submetidas ao teste de coagulase utilizando plasma de coelho (Newprov, Brasil). Os resultados foram expressos em UFC/g de queijo.

2.6 Análises Físico-Químicas:

As análises de umidade, resíduo mineral fixo, pH, acidez, teor de cloreto de sódio e nitrogênio total foram realizadas em triplicata de acordo com metodologia de Pereira *et al.* (2001).

A determinação do pH dos queijos foi medida utilizando o peagâmetro de bancada digital, (BEL Engineering®, Itália, modelo pH 38w) acoplado com eletrodo de imersão, previamente calibrado. O teor de umidade foi determinado por gravimetria em estufa regulada a 50°C procedendo-se pesagens até peso constante. O resíduo mineral fixo foi obtido por incineração de frações das amostras de queijo em forno tipo mufla a 500°C. O porcentual de cloreto de sódio foi efetuado pelo doseamento nas cinzas, seguido pela titulação da reação do nitrato de prata com os cloretos em presença de cromato de potássio, até viragem característica. A acidez foi realizada através da titulação utilizando solução alcalina de hidróxido de sódio 0,1 mol/L em presença de fenolftaleína, sendo os resultados expressos em teor de ácido láctico. A determinação do nitrogênio total foi realizada pelo método formol.

O teor de lipídios foi determinado pelo método butirométrico para queijos utilizando butirômetro de leite (BRASIL, 2006).

Atividade de água foi realizada utilizando o equipamento digital Aqualab series 4 TE (Pullman, Washington).

Umidade, resíduo mineral fixo, pH, acidez, teor de cloreto de sódio e atividade de água foram analisadas nos tempos 1,4,7,12,17 e 22 dias. Nitrogênio total e lipídeos foram analisados nos tempos 4 e 22 dias.

2.7 Análise estatística:

Foi realizado um delineamento em blocos casualizados com parcela subdividida, os blocos foram representados pelos 2 produtores, a parcela corresponde as condições de maturação em dois níveis (8°C e ambiente) e a sub-parcela equivale ao tempo de maturação (1, 4, 7, 12, 17, 22 dias). A normalidade, independência dos resíduos e homogeneidade de variância foram avaliadas por meio dos testes de Shapiro-Wilk, Durbin-Watson e Levene, respectivamente. O nível de significância estatística para todas as análises foi de 0,05. Para os parâmetros físico-químicos significativos, pela análise de variância, procedeu-se a análise de regressão linear em função do tempo de maturação, sendo os critérios para escolha do modelo a significância, maior coeficiente de determinação e menor erro padrão. As correlações foram investigadas empregando-se os coeficientes de correlação de Pearson. Os resultados foram analisados utilizando os softwares SAS® University Edition (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA) e Microsoft® Excel 2013 (Microsoft Corporation).

Cada curva de sobrevivência de *L. monocytogenes* em função do tempo nas diferentes condições de maturação foi ajustada para o melhor modelo que descreve o comportamento

observado utilizado o software GInaFIT (Geeraerd, A.H. et al., 2005). A escolha do modelo foi baseada nos melhores ajustes para os parâmetros RMSE (Raiz do quadrado médio do erro) e no coeficiente de determinação (R^2). Para fins de ajuste de modelos, adotou-se população de 5 UFC/g, que é metade do limite de detecção do método, para as amostras que *L. monocytogenes* não foi detectada.

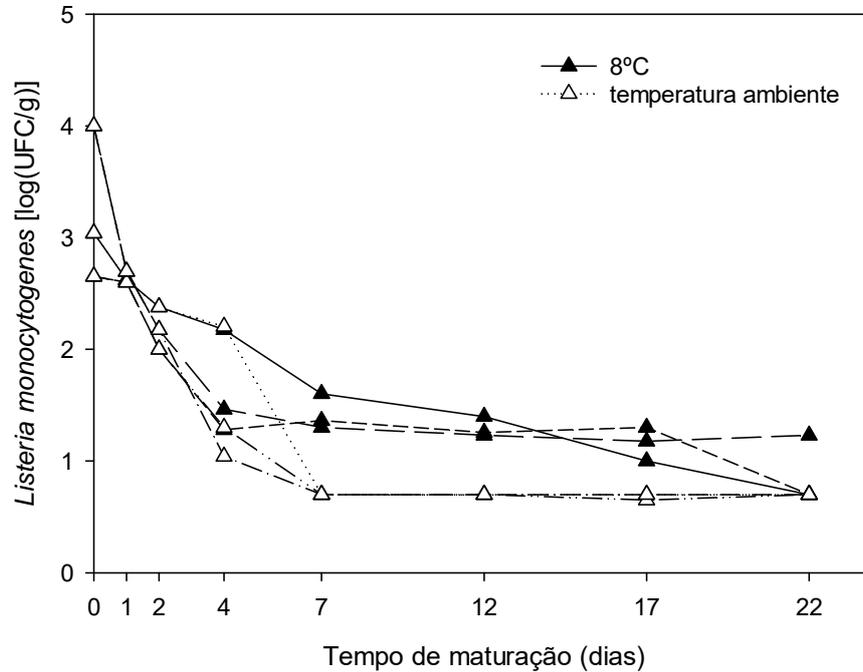
3. Resultados e discussão:

A presença de *L. monocytogenes* não foi detectada nas amostras controle. A temperatura do ambiente de maturação teve média aferida em 21,5 °C, com valores mínimo e máximo de 17,2°C e 26,3°C, respectivamente. Já a média da umidade relativa do ambiente foi de 72%, com mínimo de 45% e máximo de 89%.

O comportamento de *L. monocytogenes* durante a maturação foi distinto entre as temperaturas de maturação. Nos queijos maturados a temperatura ambiente, *L. monocytogenes* não foi mais detectada (população < 10 UFC/g) a partir do 7º dia de produção dos queijos. Nos queijos maturados com controle de temperatura (8°C) houve diferentes períodos de inativação da *L. monocytogenes* de uma amostra de queijo para outra. Em 22 dias de maturação houve inativação em duas repetições, não ocorrendo o mesmo para uma repetição que, ao final dos 22 dias, apresentou uma contagem de 1,2 log (Figura 1)

Apesar da *L. monocytogenes* não ter sido inativada em uma das repetições, percebe-se redução considerável nas contagens deste patógeno. Entre o inóculo inicial e a contagem final, aos 22 dias, houve redução média de, aproximadamente, 3 log UFC/g. Estes resultados mostram que a ação da microbiota endógena do leite, associado com a ação das bactérias do fermento natural láctico, não foram suficientes para garantir a ausência da *L. monocytogenes* aos 22 dias, quando o queijo foi maturado a 8°C. A natureza psicrófila da *Listeria* sp. pode ter contribuído para a sobrevivência a baixa temperatura, mesmo competindo com a microbiota endógena (PINTO *et al.*, 2009; CAMPAGNOLLO *et al.*, 2018).

Figura 1- Comportamento de *L. monocytogenes* em diferentes condições de maturação do queijo minas artesanal do Serro.



Resultados semelhantes foram encontrados por Durmaz (2009) em queijos artesanais italianos, Cosciano-Cunico *et al.* (2015) em queijos turcos e Bellio *et al.* (2016) em queijo italiano fatiado e embalado à vácuo, os quais relataram que *L. monocytogenes* conseguiu sobreviver nos queijos durante o período de maturação, armazenados sob refrigeração apresentando contagens praticamente constantes até o final do armazenamento.

As condições de maturação foram determinantes no comportamento de *L. monocytogenes*, pois nas amostras maturadas a temperatura ambiente e na condição desembalado, a inativação da *L. monocytogenes* ocorreu aos 7 dias de maturação, devido ao efeito significativo do aumento do pH, acidez e cloreto de sódio e diminuição acentuada nos teores de umidade e atividade de água, criando um ambiente desfavorável ao crescimento deste patógeno. Entretanto nas amostras maturadas com controle de temperatura e na condição embalado maiores teores de umidade e atividade de água foram encontradas favorecendo a sobrevivência da *L. monocytogenes*.

Valero *et al.* (2014) pesquisando a inibição de *L. monocytogenes* em queijo de leite de ovelha cru, constataram que a taxa de inativação deste patógeno aumentou proporcionalmente com a temperatura de maturação. *L. monocytogenes* foi inativada a temperatura de 22° C em 77 dias, ao passo que nas amostras refrigeradas, esta inativação ocorreu somente aos 114 dias.

Pesquisas recentes envolvendo o processo de maturação do QMA do Serro e *Listeria* spp. foram realizadas e entre elas temos: Martins *et al.* (2015) não detectaram a presença de *L. monocytogenes* em nenhuma das 256 amostras de queijos analisados. Enquanto que, Brumado (2016) constatou que o processo de maturação mostrou-se imprescindível para redução dos patógenos presentes nos queijos. *L. monocytogenes* foi detectada após dois dias de fabricação em 11 dos 12 queijos analisados, porém não foi mais detectada com 8 dias de maturação. Entretanto em estudo realizado por Pinto *et al.* (2009), *Listeria innocua* conseguiu sobreviver ao processo de maturação demonstrando ao final de 60 dias contagens superiores a 3 log UFC/g.

O modelo de melhor ajuste foi o modelo descrito por Geeraerd *et al.* (2000):

$$N = (N_o - N_{residual}) \times e^{(-K_{max} \times t)} + N_{residual}$$

Os parâmetros do modelo de inativação de *L. monocytogenes* de melhor ajuste, durante a maturação, são apresentados na Tabela 1.

Tabela 1. Parâmetros do modelo de melhor ajuste da inativação de *L. monocytogenes* durante a maturação do QMA do Serro.

Temperatura (°C)	Repetição	Parâmetros do modelo*			
		$k_{m\acute{a}x}$ (h ⁻¹)	RMSE	R ²	(logUFC/g)
8	1	0,0146	0,18	0,96	0,81
	2	0,0405	0,26	0,92	1,13
	3	0,0907	0,16	0,98	1,27
	média	0,059			
20	1	0,0312	0,24	0,96	0,62
	2	0,0378	0,11	0,98	0,66
	3	0,0815	0,16	0,98	0,72
	média	0,058			

* Geeraerd *et al.* (2000)

A taxa de inativação de *L. monocytogenes*, em média, foi similar para as temperaturas avaliadas (Tabela 1). Contudo, nos queijos maturados com controle de temperatura (8°C), observou-se uma população residual de 1,13 a 1,27 logUFC/g após 22 dias, enquanto que na maturação a temperatura ambiente a população de *L. monocytogenes* não foi mais detectada (< 1,0 logUFC/g) a partir do 7º dia de maturação. Este resultado é coerente uma vez que nos dois primeiros dias de maturação os queijos passam pela etapa salga, que ocorreu à temperatura ambiente. Somente no segundo dia é que a temperatura de refrigeração terá

influência. A inativação log-linear observada nos queijos refrigerados, até o 7º dia de maturação, pode ser influenciada pelas alterações ocorridas nos dois primeiros dias quando estavam estocados sob temperatura ambiente.

A população de *L. monocytogenes* foi significativamente correlacionada fracamente com o pH ($r=-0,334$; $p=0,047$), e fortemente com umidade ($r=0,695$; $p<0,001$) e atividade de água ($r=0,702$; $p<0,001$). Observa-se que a disponibilidade de água na matriz do queijo foi fator intrínseco determinante para o comportamento dessa bactéria no queijo minas artesanal, o que explica a maior viabilidade da *L. monocytogenes* na maturação do queijo embalado e mantido a 8°C.

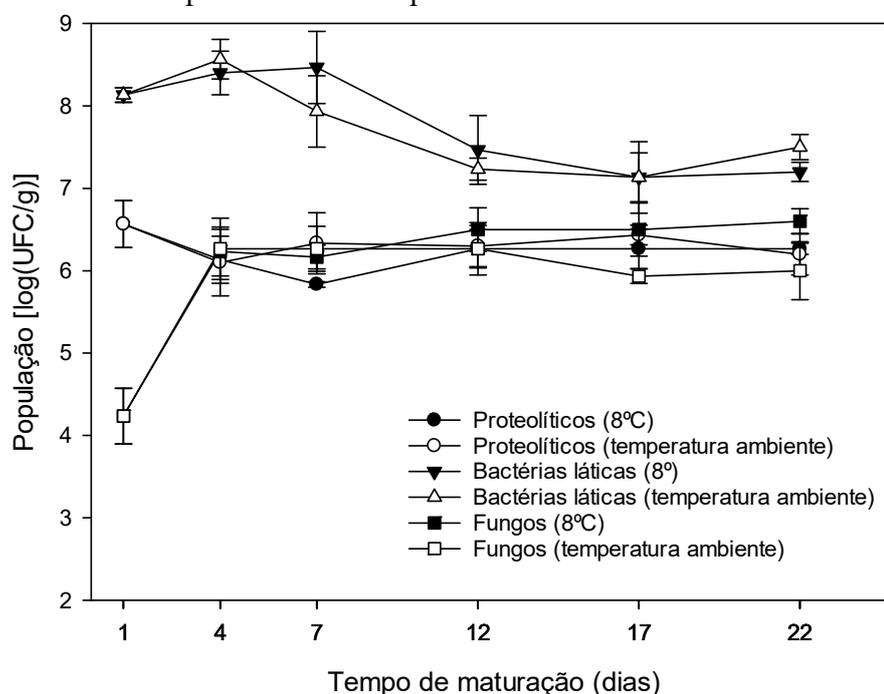
As condições de maturação foram fundamentais para garantia da segurança microbiológica do queijo minas artesanal do Serro, considerando o período mínimo de maturação de 17 dias a temperatura ambiente com preconizado pela legislação. A *L. monocytogenes* foi mais resistente às transformações ocorridas nos queijos na maturação com temperatura controlada (8°C), o que não se observou na maturação em temperatura ambiente.

Em relação aos micro-organismos autóctones do queijo, as maiores populações enumeradas foram de bactérias lácticas, seguida por bactérias proteolíticas, fungos filamentosos e leveduras (Figura 2).

As contagens das BAL foram similares entre as amostras, indicando a importância desta microbiota no queijo. No geral as contagens no tempo 1 se situaram em 8 log UFC/g, (Figura 2) ao final dos 22 dias as amostras apresentaram queda, atingindo contagens na faixa de 7 log UFC/g.

Resultados semelhantes foram encontrados por Aquilant *et al.* (2006) e Luiz *et al.* (2017) investigaram a população de BAL no queijo artesanal Canestrato Pugliese e QMA da região de Araxá, respectivamente e verificaram que todas as amostras atingiram contagens de 9 log UFC/g e 8 log UFC/g durante a primeira semana, porém houve uma ligeira queda nas contagens de BAL no decorrer do período de maturação.

Figura 2 - Evolução da população de micro-organismos proteolíticos, bactérias ácido-lácticas e fungos durante a maturação do queijo minas artesanal do Serro em diferentes condições. As barras representam o erro padrão da média.



Pesquisa realizada por Lima *et al.* (2009) em queijo fabricado na Serra do Salitre, a contagem média de BAL foi de 7,14 log UFC/g, Castro *et al.* (2016) encontrou média de 8,7 log UFC/g na estação seca e 8,5 log UFC/g na estação chuvosa no QMA produzido na região Campos das Vertentes. Santos, 2010 constatou contagens médias de 8,28 log UFC/g e 8,07 UFC/g para queijos do Serro maturados em refrigeração e temperatura ambiente, respectivamente.

Perin *et al.* (2017) encontrou contagens médias de BAL de 5,4 log UFC/g no queijo do Serro, sendo mais prevalentes: *Lactobacillus spp.*, *Enterococcus faecalis* e *Weissella*. Já Campagnollo *et al.*, (2018) constatou que cepas de BAL isoladas de QMA, incluindo o queijo artesanal do Serro, demonstraram potencial atividade antagonista contra *L. monocytogenes* em 48% dos isolados testados. Estes isolados adicionados em queijos contaminados com *L. monocytogenes* foram responsáveis pela redução de 5,8 log UFC/g deste patógeno em 22 dias de maturação.

O comportamento de BAL não foi fortemente correlacionado com os parâmetros físico-químicos, observou-se uma moderada correlação com umidade ($r=0,461$; $p<0,005$), atividade de água ($r=0,436$; $p<0,008$) e cloreto ($r=-0,455$; $p<0,006$), e fracamente correlacionado com o pH ($r=-0,381$; $p<0,03$).

Tendo em vista a contagem de fungos filamentosos e leveduras pode-se afirmar que o comportamento destes em todas as amostras foi semelhante. No geral, apresentaram um aumento de 2 log UFC/g do tempo 1 ao tempo de 4 dias e mantiveram contagens constantes de 6 log UFC/g até os 22 dias. (Figura 2).

Gardini *et al.* (2006) avaliaram o queijo Pecorino durante o período de maturação e obtiveram alta contagens de bolores e leveduras em média de 5 log UFC/g se mantendo estáveis até o final da maturação de 60 dias. Manolopoulou *et al.* (2003) constatou contagem média de leveduras encontradas no queijo Feta ao longo de 120 dias de maturação variou de 2,57 log UFC/g a 5,2 log UFC/g, Castro *et al.* (2016) encontrou contagens médias de 7 log UFC/g e 6,14 log UFC/g no QMA Campo das Vertentes, no período da seca e chuva, respectivamente.

Cardoso *et al.* (2015) avaliaram a ocorrência de fungos no queijo minas artesanal do Serro e encontraram três espécies de fungos predominantes *D. hansenii*, *K. ohmerie* *K. marxianus*. As contagens médias apresentadas pelos fungos aumentaram significativamente, oscilando de 5,51 log UFC/g a 6,82 log UFC/g após 3 a 15 dias de maturação na estação seca e 5,28 log UFC/g para 7,42 log UFC/g após a maturação de 3 a 15 dias, na estação chuvosa e ambas permaneceram estáveis até o final da maturação.

O comportamento não foi fortemente correlacionado com os parâmetros físico-químicos, a população mostrou-se moderadamente correlacionados com o pH ($r=0,464$; $p<0,005$) e fracamente com cloreto ($r=0,376$; $p<0,03$) e umidade ($r= -0,371$; $p<0,03$), mas não foi correlacionado com a atividade de água.

O comportamento dos micro-organismos proteolíticos, em todas as amostras, foi relativamente uniforme, apresentando contagens médias de 6 log UFC/g, durante os 22 dias de maturação e em ambas temperaturas de armazenamento empregadas (Figura 2).

No presente estudo as contagens médias de micro-organismos proteolíticos se situaram em torno de 6 log UFC/g, porém estes valores refletem deficiência na higiene durante processamento do queijo, já que o leite utilizado na produção do queijo não sofre tratamento térmico.

Tamagnini *et al.* (2006) encontrou contagens médias de micro-organismos proteolíticos em queijo *Crottin*, produzido com leite de cabra, de 4,4 log UFC/g no verão e 4,3log UFC/g no inverno, com redução de 2 log UFC/g em 36 dias de maturação. Ozdemir e Demirci, (2006) constataram contagens médias, no queijo *Kashar*. de 7,6 log UFC/g, apresentando aumento durante o período de maturação. Awad *et al.* (2005) constataram a

presença de altas contagens de bactérias proteolíticas no queijo *Damietta* 6,5 log UFC/g e *Kariesh* 12,5 log UFC/g. A presença de bactérias proteolíticas nestas amostras de queijo artesanal egípcio refletiram as condições de fabricação e manipulação inadequadas, bem como ausência de tratamento térmico.

Fernandez, Jagus e Mugliaroli (2014) encontraram contagens médias de 1,8 log UFC/g na ricota no dia de fabricação e demonstraram aumento durante armazenamento, chegando a contagens médias de 9,5 log UFC/g aos 10 dias de fabricação. Para os autores, esse aumento no número de micro-organismos proteolíticos se deve a manipulação no pós-processamento (refrigeração, fracionamento e embalagem) e exposição à contaminação ambiental.

Diferentemente das BAL e dos fungos, os micro-organismos proteolíticos parecem não serem influenciado pela variação dos parâmetros físico-químicos do queijo durante a maturação, a exceção foi com o cloreto que se mostrou negativa e francamente correlacionado ($r=-0,281$; $p<0,03$).

A população de *Staphylococcus* coagulase positiva apresentou redução na população ao longo da maturação, entretanto se mostrou mais sensível na condição de maturação refrigerada e embalada, porém persistiu com população acima de 3 log UFC/g em todas as condições de maturação.

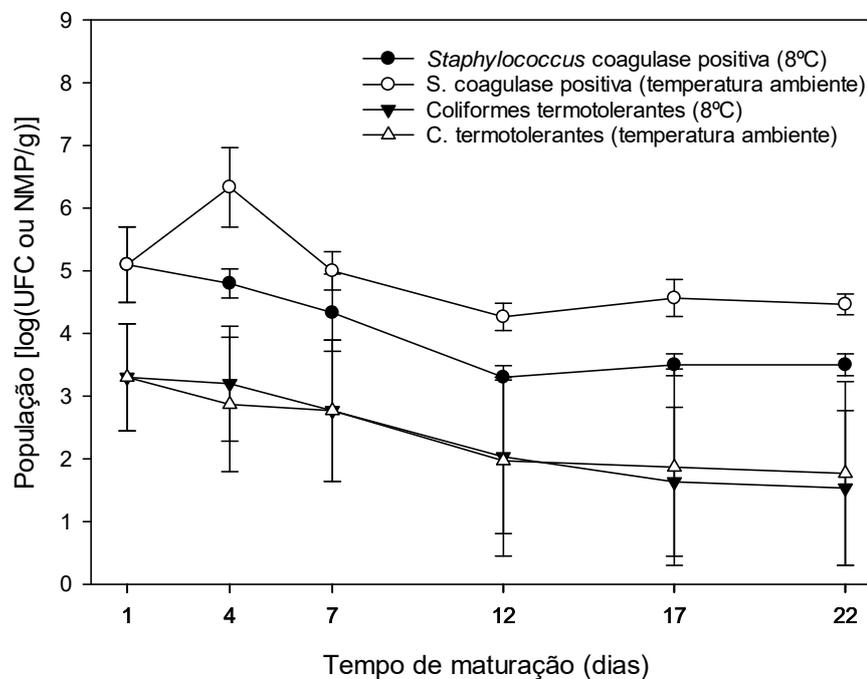
A legislação estadual estabelece como limite para comercialização do QMA, população máxima de 3 log UFC/g de *S. aureus* (MINAS GERAIS, 2008) e para comercialização do QMA do Serro, maturação por 17 dias a temperatura ambiente (IMA, 2013). Entretanto nenhuma amostra atingiu os valores estabelecidos pelas legislações estaduais ao final dos 17 dias de maturação (Figura 3).

As condições de maturação influenciaram diferentemente a população de *Staphylococcus* coagulase positiva ao longo dos 22 dias avaliados, os queijos maturados a temperatura ambiente sem embalagem apresentaram, em média, população 1 log UFC/g maior que as amostras maturadas sob controle de temperatura (8°) e embaladas à vácuo ($p<0,05$). A população de *Staphylococcus* coagulase positiva no queijo praticamente manteve-se estável ao longo dos 22 dias na maturação a temperatura ambiente, com diferença de 0,6 log UFC/g, sendo fracamente correlacionada com o pH ($r=-0,404$; $p<0,02$) e o teor de cloreto ($r=-0,348$; $p<0,04$).

A presença deste micro-organismo no queijo se deve a sua natureza ubiqüitária, com isso as práticas inadequadas de processamento do leite cru e fabricação dos queijos, de

contaminação cruzada através de utensílios e hábitos de higiene não adequados dos ordenhadores ou manipuladores que, muitas das vezes, desconhecem o fato de serem portadores assintomáticos de *S. aureus* colaboram com a contaminação do queijo (ASSUMPTÃO *et al.*, 2003, BORGES *et al.*, 2003; ANDRÉ *et al.*, 2008). Dessa forma o processo de maturação por si só, não conseguiu reduzir as contagens de *S. aureus* a níveis seguros, uma vez que, a inocuidade do queijo depende do cumprimento de todos os requisitos apresentados acima.

Figura 3- Evolução da população de *Staphylococcus* coagulase positiva e coliformes termotolerantes durante a maturação do queijo minas artesanal do Serro em diferentes condições. As barras representam o erro padrão da média.



No entanto resultados diferentes foram encontrados por Martins *et al.* (2015) e Dores, Nóbrega e Ferreira (2013) ao avaliarem o processo de maturação do Queijo Artesanal do Serro e Canastra. Estes autores relataram que, para o queijo maturado em temperatura ambiente, o período mínimo de 17 dias para o QMA do Serro e de 22 dias para QMA da Canastra seriam suficientes para que padrões microbiológicos exigidos pela legislação para *S. coagulase* positiva fossem atingidos.

Perin *et al.* (2017) encontrou em queijos artesanais mineiros contagens de *S. aureus* coagulase positiva maiores que 4 log UFC/g, incluindo o QMA do Serro. Da mesma forma, Castro *et al.* (2016) também constatou em as amostras do queijo artesanal produzido na região do Campo das Vertentes contagens de *S. aureus* superiores a 4 log UFC/g. A presença desta

bactéria em contagens altas podem produzir enterotoxinas em quantidades capazes de provocar intoxicação alimentar sugerindo risco significativo para os consumidores (JOHLER et al., 2015).

As contagens de coliformes termotolerantes são consideradas indicadores de contaminação fecal, sugerindo práticas de fabricação inadequadas. Esta contaminação pode originar do leite cru durante a ordenha manual, armazenamento não refrigerado e transporte, e possível contaminação do queijo durante fabricação (CHAMBERS, 2002; PERIN *et al.*, 2017).

No que diz respeito às contagens de coliformes termotolerantes, diferentemente do que foi observado para *Staphylococcus* coagulase positiva, não houve diferença estatisticamente significativa ($p > 0,05$) entre as condições de maturação ao longo dos 22 dias (Figura 3). Em relação aos parâmetros físico-químicos, o comportamento de coliformes foi correlacionado significativamente somente com a umidade dos queijos ($r = 0,475$; $p < 0,004$), que mostra a capacidade de adaptação das bactérias desse grupo na matriz do queijo minas artesanal do Serro.

A legislação estadual estabelece como limite máximo para comercialização do QMA, coliformes termotolerantes a população de 2 log UFC/g. Em ambas condições de maturação as populações finais de coliformes termotolerantes estavam satisfatórios e, relação aos parâmetros estabelecidos pela legislação, destacando a importância da maturação na melhoria da qualidade do queijo minas artesanal.

As características físico-químicas dos queijos maturados em diferentes condições ao longo do tempo (1, 4, 7, 12, 17 e 22 dias) estão apresentados na Tabela 2. O único parâmetro que não apresentou variação significativo foi a acidez titulável, especificamente para a maturação com embalagem a vácuo e temperatura de 8 °C. Na condição de maturação do queijo sem embalagem e a temperatura ambiente, observa-se um leve aumento ao longo dos 22 dias ($p = 0,06$). Esse resultado corrobora com os resultados obtidos por Brumado, 2016 e Figueiredo, 2014. No entanto, Martins *et al.* (2015) constatou que o teor de acidez do queijo do Serro não foi afetado pela temperatura e pelo período de maturação.

O teor de acidez nos queijos está diretamente associado à quantidade de lactose fermentada pelos micro-organismos (GALÁN *et al.*, 2012). Por sua vez a concentração inicial de lactose na massa do queijo é determinada pela quantidade de soro drenado na produção do queijo, assim como pela quantidade de micro-organismos fermentadores de lactose presentes

na massa e das condições favoráveis a esta fermentação pelos micro-organismos como temperaturas elevadas (MORENO *et al.*, 2002)

As amostras de queijo maturadas a temperatura ambiente e temperatura controlada (8°C) apresentaram aumento no valor de pH ($p < 0,05$) (Tabela 2). Este aumento se deve a degradação proteica pela ação de proteases com a formação de compostos alcalinos (BERTOLINO *et al.*, 2011; MARTINS *et al.*, 2015), que neutralizam os prótons liberados durante a transformação da lactose em ácido láctico, assim é comum o aumento do pH durante a maturação (FIGUEIREDO, 2014).

Os valores de pH obtidos nesta pesquisa se aproximam de valores encontrados por Martins *et al.* (2015); Figueiredo, 2014; Pinto *et al.*, (2011), Brumado, 2016, que constataram aumento do pH do QMA do Serro, durante o período de maturação. Apesar da variação pouco acentuada, o aumento do pH ao longo do tempo foi maior (~2,7 vezes) na maturação a 8 °C do que a temperatura ambiente.

Houve diminuição da umidade em todas as amostras. Entretanto, nos queijos maturados em temperatura ambiente a redução ao longo do tempo foi mais acentuada. Esse resultado era previsível devido ao queijo maturado em temperatura ambiente não ser embalado, o que não ocorre nos queijos maturados embalados a vácuo e mantido a 8°C, condição que dificulta a perda de umidade para o ambiente.

Na resolução nº 7 de 28 de novembro de 2000 QMA do Serro é classificado como de média umidade (36 a 45,9g/100g). No presente trabalho, os queijos apresentaram umidade média inicial de 45,20 % sendo classificados como média umidade. Ao final dos 22 dias de maturação, os queijos armazenados em temperatura controlada (8°C) apresentaram umidade de 39,63 % sendo ainda classificados como média umidade. No entanto os queijos maturados à temperatura ambiente apresentaram umidade média final de 24,83% sendo classificados como baixa umidade (BRASIL, 1996). A perda de umidade ao longo do tempo foi três vezes maior no queijo maturado sem embalagem a temperatura ambiente que no queijo embalado e mantido a 8 °C.

Tabela 2. Parâmetros físico-químicos do queijo minas artesanal do Serro durante a maturação em diferentes condições.

Parâmetros	Maturação	Tempo de maturação (dias)					
		1	4	7	12	17	22
Acidez (% ácido láctico)	8 °C	0,57* (0,13)	0,62 (0,07)	0,73 (0,13)	0,52 (0,11)	0,45 (0,13)	0,47 (0,13)
	Ambiente**	0,57 (0,13)	0,56 (0,12)	0,64 (0,08)	0,65 (0,11)	0,70 (0,14)	0,75 (0,12)
		$\hat{Y} = 0,66 \quad P = 0,10 \quad R^2 = 0,16$					
pH	8 °C	5,01 (0,14)	5,33 (0,23)	5,17 (0,15)	5,47 (0,15)	5,69 (0,08)	6,01 (0,14)
	Ambiente	5,01 (0,14)	5,24 (0,22)	5,25 (0,16)	5,29 (0,14)	5,37 (0,11)	5,50 (0,00)
		$\hat{Y} = 4,98 + 0,044X \quad P < 0,01 \quad R^2 = 0,76$					
Cloreto de sódio (%)	8 °C	0,46 (0,01)	0,68 (0,01)	0,75 (0,04)	0,57 (0,04)	0,63 (0,04)	0,95 (0,04)
	Ambiente	0,46 (0,01)	0,55 (0,03)	0,78 (0,03)	0,92 (0,10)	0,81 (0,04)	1,04 (0,04)
		$\hat{Y} = 0,528 \quad P = 0,15 \quad R^2 = 0,44$					
Umidade (%)	8 °C	45,20 (3,87)	45,07 (3,42)	43,83 (2,44)	42,17 (2,09)	41,10 (0,60)	39,63 (0,36)
	Ambiente	45,20 (3,87)	39,53 (2,62)	35,93 (1,91)	31,00 (4,27)	30,17 (1,89)	24,83 (2,38)
		$\hat{Y} = 45,76 - 0,28X \quad P < 0,01 \quad R^2 = 0,36$					
Atividade de água	8 °C	0,98 (0,01)	0,98 (0,01)	0,97 (0,00)	0,96 (0,00)	0,96 (0,00)	0,96 (0,00)
	Ambiente	0,98 (0,01)	0,97 (0,01)	0,95 (0,00)	0,92 (0,01)	0,92 (0,01)	0,89 (0,01)
		$\hat{Y} = 0,979 - 0,001X \quad P < 0,001 \quad R^2 = 0,58$					
Resíduo mineral fixo (%)	8 °C	4,29 (1,74)	3,42 (0,50)	3,17 (0,21)	3,27 (0,51)	4,73 (1,79)	3,33 (0,70)
	Ambiente	4,29 (1,74)	3,32 (0,41)	3,86 (0,19)	4,19 (0,54)	4,89 (0,98)	4,46 (0,84)
Proteína (%)	8 °C	10,57 (0,51)					11,00 (0,67)
	Ambiente	10,60					12,23

		(0,47)	(0,49)
Gordura no extrato seco (%)	8 °C	46,25 (1,07)	48,73 (2,35)
	Ambiente	48,69 (0,83)	52,28 (0,64)

* Média (desvio padrão); ** média da temperatura ambiente foi de 21,5°C.

Diretamente ligado à perda de umidade, observa-se um aumento do teor de cloreto de sódio e uma diminuição da atividade de água, principalmente nas amostras maturadas sem embalagem a temperatura ambiente (Tabela 2). Resultados semelhantes foram obtidos por Machado *et al.* (2004); MARTINS *et al.* (2015) e Brumado (2016).

A salga do queijo realizada neste experimento foi baseada na quantidade de sal habitualmente acrescentada aos queijos pelos produtores do Serro. Todavia não há padronização na quantidade de sal adicionada. Desta forma, pode-se encontrar queijo do Serro no mercado com diferentes teores de cloreto. Machado *et al.* (2004) encontrou alto coeficiente de variabilidade em relação ao cloreto e Martins *et al.* (2015) constatou maiores médias no teor de cloreto na estação seca, explicado pelo tipo de salga utilizado pelos queijeiros, a seco, que não possibilita uma padronização adequada do teor de sal no queijo, podendo haver variações, além disso, umidade e temperatura locais irão influenciar as características finais dos produtos.

A atividade de água (A_w) diminuiu durante a maturação em todas as amostras. O índice de maturação e teor de sal, bem como teor de umidade determina a A_w final do queijo. A influência da maturação está ligada a presença de aminoácidos provenientes da proteólise, apresentando cadeias laterais contendo grupos polares que reagem com a água e dessa forma reduzem a A_w , já o efeito do teor de NaCl é explicado pelo baixo peso e alta solubilidade, existindo fortes interações entre este sal e água, sendo assim a A_w é reduzida na presença de NaCl (PINTO *et al.*, 2011). A diminuição da medida de atividade de água ao longo do tempo de maturação foi quatro vezes maior no queijo maturado sem embalagem na temperatura ambiente que no maturado embalado a 8°C (Tabela 2).

Os teores de proteína e gordura aumentaram durante a maturação, em função da perda de umidade e aumento na concentração dos constituintes sólidos. Resultados semelhantes foram encontrados por Pinto *et al.* (2011); Figueiredo *et al.* (2014); Martins *et al.* (2015); Brumado (2016). A portaria nº146 de 07 de março de 1996 estabelece a classificação dos queijos de acordo com o teor de gordura presente no extrato seco (GES), baseado nesta

classificação os queijos analisados independentemente da temperatura de maturação apresentaram teores na faixa 45 a 59,9%, (Tabela 2) sendo classificados como gordos, os valores encontrados neste estudo foram semelhantes a resultados de estudos anteriores no QMA do Serro realizados por Brumado (2016), Figueiredo *et al.* (2014) e Martins *et al.* (2015).

O resíduo mineral fixo representa os elementos não orgânicos presentes no alimento. Entre os sais encontrados nos queijos temos cálcio, fosfatos e cloreto de sódio adicionado. Os teores de resíduo mineral fixo variaram de 3,17 a 4,89 % sendo a média dos queijos maturados em temperatura controlada 3,7% e dos queijos maturados em temperatura ambiente 4,17%. Resultados semelhantes de resíduo mineral fixo em queijo do Serro foram encontrados por Machado *et al.* (2004) e Figueiredo (2014), os teores médios se situaram na faixa de 3,79% e 3,72% respectivamente.

Conclusão:

A maturação do queijo minas artesanal a temperatura ambiente sem embalagem foi efetiva para reduzir a população de *L. monocytogenes* dentro do período descrito na legislação, enquanto que na maturação do queijo embalado e mantido à 8°C foi possível detectar a presença da bactéria até o período de 22 dias de maturação. Conforme legislação estadual (IMA, 2013), o período mínimo de maturação do queijo artesanal do Serro deve ser por um período mínimo de 17 dias em temperatura ambiente.

Apesar de apresentar redução lenta na população ao longo da maturação nas duas condições avaliadas, a população de *Staphylococcus coagulase* positiva persistiu acima do limite máximo estabelecido (3 logUFC/g) ao longo dos 22 dias avaliados. Comportamento similar foi observado para os coliformes termotolerantes.

A variação nos parâmetros físico-químicos ao longo da maturação influenciou mais significativamente o comportamento da *L. monocytogenes* do que os outros grupos de micro-organismos, especificamente a umidade e a atividade de água. A variação na população de micro-organismos não teve fortemente correlação com a variação observadas nos parâmetros físico-químicos avaliados.

Dessa forma é imprescindível à adoção de boas práticas de fabricação na produção do QMA do Serro, além de melhoria na qualidade da matéria prima, treinamento dos queijeiros, quanto à higienização pessoal e ambiental adequadas. Essas medidas vão de encontro a um queijo com melhor qualidade microbiológica, além do desenvolvimento de mais estudos que procurem conhecer o comportamento de micro-organismos patogênicos como *Listeria monocytogenes* e *S. aureus* a fim de se estabelecer tempos de maturação do queijo minas artesanal que garantam segurança no consumo deste produto.

Referências

ANDRÉ, M. C.D.P.B., et al. Comparison of *Staphylococcus aureus* isolates from food handlers, raw bovine milk and Minas Frescal cheese by antibiogram and pulsed-field gel electrophoresis following small digestion. *Food Control*; v. 19 p. 200–207, 2008.

ASSUMPÇÃO, E. G. *et al.* Fontes de contaminação por *Staphylococcus aureus* na linha de processamento do queijo prato. *Arquivo Brasileiro Medicina Veterinária e Zootecnia*. v.55, n.3, 2003.

AQUILANT, L. et al. Resident lactic acid bacteria in raw milk Canestrato Pugliese cheese. *Letters in applied microbiology*. v.43, n. 2 p.161 -167, 2006.

ANGELIDIS, A. S.; BOUTSIOUKI, P. ; PAPAGEORGIOU, D. K. Loss of viability of *Listeria monocytogenes* in contaminated processed cheese during storage at 4, 12 and 22° C. *Food Microbiology*, v. 27, p. 809-818, 2010.

AWAD, E. I., ABD-EL AAL, S. F. A., IBRAHIM, M. A. Occurrence of proteolytic bacteria in milk and some dairy products. *Zagazig Veterinary Journal*, n. 3, v. 33, p. 183–189, 2005.

BELLIO, 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.

BERTOLINO, M. et al. Evolution of chemico- physical characteristics during manufacture and ripening of Castel magno PDO cheese in wintertime. *Food Chemistry*, v.129, p.1001-1011, 2011.

BORGES, M.F. et al. Microrganismos patogênicos e indicadores em queijo de coalho produzido no Estado do Ceará, Brasil. *Boletim do Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos*, v. 21, n. 1, p. 31-40, 2003.

BRASIL. Portaria n. 146, de 07 de março de 1996. Regulamentos Técnicos de Identidade e Qualidade dos Produtos Lácteos. Ministério da Agricultura e do Abastecimento. Secretaria Nacional de Inspeção de Produtos de Origem Animal. *Diário Oficial da União*, Brasília, DF, 11 mar. 1996.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Decreto nº 9.013, de 29 de março de 2017. Regulamenta a Lei nº 1.283, de 18 de dezembro de 1950, e a Lei nº 7.889, de 23 de novembro de 1989, que dispõem sobre a inspeção industrial e sanitária de produtos de origem animal. 2017.

BRUMADO, E. C. C. **Impacto do tipo de fermento endógeno na qualidade e tempo de maturação de queijo minas artesanal produzido em propriedades cadastradas pelo IMA**

(Instituto Mineiro de Agropecuária) na região do Serro-MG. Tese (Doutorado Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Viçosa, Minas Gerais, 2016.

BUCHANAN, R. L. *et al.* A review of *Listeria monocytogenes*: An update on outbreaks, virulence, dose-response, ecology, and risk assessments. **Food Control**, v.75, p. 1-13, 2017.

CAMPAGNOLLO, F. B. *et al.* Selection of indigenous lactic acid bacteria presenting anti-listerial activity, and their role in reducing the maturation period and assuring the safety of traditional Brazilian cheeses. **Food Microbiology**, n.73, p. 288-297, 2018.

CARDOSO, V. M. *et al.*, The influence of seasons and ripening time on yeast communities of a traditional Brazilian cheese. **Food Research International**, v. 69 p. 331–340, 2015.

CASTRO, R. D. *et al.* Lactic acid microbiota identification in water, raw milk, endogenous starter culture, and fresh Minas artisanal cheese from the Campo das Vertentes region of Brazil during the dry and rainy seasons. *Journal Dairy Science*, v.99, p. 6086–6096, 2016.

CHAMBERS, J.V. The microbiology of raw milk. In: **Dairy Microbiology Handbook**, 3rd edition. Robinson RK (ed.). New York: John Wiley and Sons, 2002, pp. 39–90.

COSCIANI-CUNICO, E. Behaviour of *Listeria monocytogenes* and *Escherichia coli* O₁₅₇:H₇ During the Cheese Making of Traditional Raw-Milk Cheeses from Italian Alps. *Italian Journal of Food Safety*, v.30, n. 4, p. 4583-4588, 2015.

D'AMICO, D.; DRUART, M.; DONNELLY, C.W. 60-Day aging requirement does not ensure the safety of surface-mold-ripened soft cheeses manufactured from raw or pasteurized milk when *Listeria monocytogenes* is introduced as a post-processing contaminant. **Journal of Food Protection**. v. 71, n.8, p. 1563-1571, 2008.

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

DORES, M. T. DAS., NOBREGA, J. E., FERREIRA, C. L. L. F. Room temperature aging to guarantee microbiological safety of brazilian artisan Canastra cheese. **Food Science Technology**, v.33, n. 1, p. 180-185, 2013.

DURMAZ, H. Fate of *Listeria monocytogenes* in Carra cheese during manufacture and ripening. **Journal of Food Safety**, v. 29, p. 253–260. 2009.

FAO/WHO, 2004. Risk assessment of *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat foods. Interpretative summary. FAO/WHO Microbiological Risk Assessment Series 4.

FERNÁNDEZ, M. V.; JAGUS, R. J.;MUGLIAROLI, S. L. Effect of Combined Natural Antimicrobials on Spoilage Microorganisms and *Listeria innocua* in a Whey Cheese “Ricotta”. **Food Bioprocess Technology**, n. 7, p. 2528–2537, 2014.

FIGUEIREDO, S. P. **Características do leite cru e do queijo minas artesanal produzidos na região do serro, minas gerais e, produção de queijos com doces.** Dissertação de

Mestrado. Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri. Diamantina, 2014.

GALÁN, E. *et al.* Proteolysis, microbiology and sensory properties of ewes' milk cheese produced with plant coagulant from cardoon *Cynara cardunculus*, calf rennet or a mixture thereof. **International Dairy Journal**, v.25, p.92-96, 2012.

GARDINI, F. *et al.* Characterization of yeasts involved in the ripening of Pecorino Crotonese cheese. **Food Microbiology**, 23, 641–648. 2006.

GEERAERD A.H.; HERREMANS, C.H.; VAN IMPE, J.F. Structural model requirements to describe microbial inactivation during a mild heat treatment, **International Journal of Food Microbiology**, v. 59, p. 185-209, 2000.

JOHLER, S., P. *et al.* Further evidence for staphylococcal food poisoning outbreaks caused by egc-encoded enterotoxins. **Toxins**, v. 7, p. 997–1004, 2015.

LAMBERTZ, S. *et al.* Prevalence and level of *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat foods in Sweden 2010. **International Journal of Food Microbiology**, v. 160, p.24-31,2012.

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

LUIZ, L. M. P. *et al.* Isolation and identification of lactic acid bacteria from Brazilian Minas artisanal cheese. **CyTA - Journal of Food**, v. 15, n. 1, p. 125–128, 2017.

MACHADO, E. C. *et al.* Physico-chemical and sensorial properties of artisanal Minas cheese produced in the region of Serro, Minas Gerais. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 24, p. 516–521, 2004.

MANOLOPOULOU, E. *et al.* Evolution of microbial populations during traditional Feta cheese manufacture and ripening. **International Journal of Food Microbiology**, v. 82, n. 2. 2005.

MARTINS, J. M. *et al.* Determining the minimum ripening time of artisanal Minas cheese, a traditional Brazilian cheese. **Brazilian Journal of Microbiology**. v.46, p. 219-230, 2015.

MINAS GERAIS. Portaria nº 1305, de 30 de abril de 2013 do Instituto Mineiro de Agropecuária (IMA). Estabelece diretrizes para a produção do queijo Minas artesanal. Diário Oficial do Executivo. 1 de mar. 2013.

MINAS GERAIS. Decreto nº 44.864, de 01/08/2008. Altera o regulamento da Lei nº 14.185, de 31 de janeiro de 2002, que dispõe sobre o processo de produção de queijo minas artesanal. Minas Gerais, *Diar. Exec. MG*, 2008.

MORENO, I.; COSTA, G. A. N.; VAN DENDER, A. G. F.; VIALTA, A.; LERAYER, A. L. S.; SILVA, A. T.; DESTRO, M. T. Propriedades físicas e composição química e bioquímica

durante a maturação de queijo Prato de diferentes origens. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, v. 57, n. 327, p. 270-273, 2002.

ORTENZI, R. *et al.*. Behaviour of *Listeria monocytogenes* in artisanal raw milk Pecorino Umbro cheese: a microbiological challenge test. **Italian Journal of Food Safety**, v.4, p. 5370-5378, 2015.

OZDEMIR, C; DEMIRCI, C. Selected microbiological properties of Kashar cheese samples preserved with potassium sorbate. **International Journal of Food Properties**, v.9, p. 515–521, 2006.

PEREIRA, D. B. C., SILVA, P. H. F., DE OLIVEIRA, L. L., COSTA JUNIOR, L. C. G. C. **Físico-química do leite e derivados – Métodos analíticos**. 1. ed. Juiz de Fora-MG: Oficina de Impressão Gráfica e Editora Ltda., 2001. 190 p.

PERIN, L.M. *et al.* Bacterial ecology of artisanal Minas cheeses assessed by culture-dependent and independent methods. **Food Microbiology**. v. 65, p. 160-169, 2017.

PINTO, M. S. *et al.* Survival of *Listeria innocua* in Minas Traditional Serro cheese during ripening. **Food Control**, v. 20, p. 1167–1170, 2009.

PINTO, M. S. *et al.* The effects of Nisin on *Staphylococcus aureus* count and the physicochemical properties of Traditional Minas Serro cheese. **International Dairy Journal**, v.21, p. 90–96, 2011.

SIP, A. *et al.* Anti-Listeria activity of lactic acid bacteria isolated from Golka, a regional cheese produced in Poland. **Food Control**, v. 26, p. 117-124, 2012.

RYSER, E.T. Incidence and behavior of *Listeria monocytogenes* in cheese and other fermented dairy products. In: RYSER, E.T., MARTH, E.H. *Listeria, Listeriosis and Food Safety*, Boca Raton, Flórida: CRC Press, p. 405-502, 2007.

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

SCHVARTZMAN, M.S. *et al.* Modeling the fate of *Listeria monocytogenes* during manufacture and ripening of smeared cheese made with pasteurized or raw milk. **International Journal of Food Microbiology**, v. 145, n.1, p. 31-38, 2011.

TAMAGNINI, L.M. Microbiological characteristics of Crottin goat cheese made in different seasons. **Small Ruminant Research**, v. 66, p.175–180, 2006.

TIWARI, U. *et al.* Modelling the interaction of storage temperature, pH, and water activity on the growth behavior of *Listeria monocytogenes* in raw and pasteurised semi-soft rind washed milk cheese during storage following ripening. **Food Control**, v.42, p. 248-256, 2014.

VALERO, A. *et al.* Survival kinetics of *Listeria monocytogenes* on raw sheep milk cured cheese under different storage temperatures. **International Journal of Food Microbiology**, v.184, p. 39–44. 2014.

VERRAES, C. *et al.* A review of the microbiological hazards of dairy products made from raw milk. **International Dairy Journal**, v. 50, p. 32- 44, 2015.

ZAFFARI, C. B. MELLO, J. F. COSTA, M. Qualidade Bacteriológica de queijos artesanais comercializados em estradas do litoral norte do Rio Grande do Sul, Brasil. **Ciência Rural**, v.37 n. 3, p. 362-367, 2007.

Capítulo 2

Efeito do tempo de maturação nas características físico-químicas e sensoriais do queijo minas artesanal da região do Serro.

Resumo

Esta pesquisa foi desenvolvida com o objetivo de se avaliar a influência do período de maturação nas propriedades físico-químicas e aceitação de Queijos Minas Artesanal do Serro, produzidos com diferentes fermentos (“Pingo” e “Rala”) e maturados sob diferentes condições de temperatura e embalagem. O teste de aceitação foi realizado em 5 sessões de tempo de maturação (3, 10, 17, 24 e 31 dias), com julgadores não treinados, mas declarados como consumidores habituais de queijo. Utilizou-se escala hedônica de 9 pontos para aceitação e de 5 pontos para intenção de compra dos queijos. Houve diferença ($p < 0,01$) na aceitação entre os queijos produzidos com pingo e rala e maturados embalados sob temperatura controlada 8° C dos maturados não embalados a temperatura ambiente, prevalecendo maiores escores de aceitação nos queijos maturados embalados a 8° C. A aceitação dos queijos ao longo do período de maturação foi menor naqueles maturados a temperatura ambiente ($p < 0,01$) quanto ao maturado sob temperatura controlada. A diferença na aceitação dos queijos produzidos com pingo (maior aceitação) em relação aos produzidos com rala somente foi significativa nos primeiros 24 dias de maturação, tornando-se imperceptível com 30 dias de maturação. Em relação à intenção de compra, os queijos produzidos com pingo e maturados em temperatura controlada (8°C) receberam pontuação média de 4 correspondendo a provavelmente compraria. Os queijos produzidos com rala e pingo e maturados em temperatura ambiente e rala 8° C receberam escores médios de 3 correspondendo a talvez compraria, talvez não compraria. Em relação às características físico-químicas, houve diminuição no pH, umidade e acidez. Os teores médios de resíduo mineral fixo dos queijos produzidos com pingo foram 6,44% e os queijos produzidos com rala 6,71%. O teor de cloreto de sódio se mostrou variável, sendo que os queijos produzidos com rala independentemente das condições de maturação apresentaram maiores teores de cloreto de sódio, como confirmado pelos comentários realizados pelos julgadores que consideraram o queijo produzido com rala mais salgado que o queijo produzido com pingo.

Palavras-chaves: Queijo Artesanal. Maturação. Aceitação Sensorial. Mapa de Preferência.

Effect of ripening time on physical-chemical and sensory characteristics of the artisanal minas cheese of the Serro region.

Abstract

This research was developed aiming to assess the influence of the ripening period on physical-chemical properties and acceptance of Artisanal Minas Cheese from Serro, produced with different endogenous culture (“Pingo” and “Rala”) and ripened under different ambient and packing conditions. The acceptance test was realized in 5 sessions over the ripening period (3, 10, 17, 24 and 31 days), with non-trained judges, but declared as habitual cheese consumers. The hedonic scale of 9 points was used for acceptance and of 5 points for cheeses' buying intention. There was a difference ($p < 0,01$) on acceptance between cheeses produced with “pingo” and “rala” and packed under controlled temperature of 8°C when compared from the non-packed cheeses, ripened at ambient temperature, with the acceptance scores from the packed cheeses being higher. The acceptance of cheeses over the ripening period was smaller on those ripened at ambient temperature ($p < 0,01$) than the ones ripened at controlled temperature. The difference of acceptance of cheeses produced with pingo (higher acceptance) in relation to the ones produced with rala was only significant on the first 24 days of ripening, becoming imperceptible with 30 days of ripening. Regarding purchase intentions, the cheeses produced with pingo and ripened at controlled temperature (8°C) had an average score of 4, wich means "would probably buy". The cheeses produced with rala and pingo and ripened at ambient temperature and rala at 8°C had average scores of 3, which corresponds to "maybe would buy, maybe wouldn't". As for physical-chemical characteristics, there was a decrease in pH, moisture and acidity. The average contents of fixed mineral residues on cheeses produced with pingo were 6.44%, while those of cheeses produced with rala were 6.71%. The sodium chloride content proved to be variable, with the cheeses produced with rala, regardless of the ripening conditions, presenting higher contents of sodium chloride, as confirmed by the comments made by the judges that considered the cheese produced with rala to be saltier than the cheese produced with pingo.

Keywords: Artisanal Minas cheese, Consumer Acceptance, Ripening. Map of Preference.

1.Introdução

O Queijo minas artesanal (QMA) é uma variedade de queijo produzido no Estado de Minas Gerais que se destaca como o maior produtor de queijos do Brasil. A região do Serro é uma das mais conhecidas pela produção de queijos artesanais mineiros (MARTINS *et al.* 2015). Seu território é composto por 11 cidades pequenas, com 119 produtores cadastrados no Instituto Mineiro de Agropecuária (IMA, 2018).

A técnica de produção do queijo artesanal do Serro nos últimos 200 anos, se manteve inserida no meio rural utilizando procedimentos tradicionais, sendo assim ainda, não há padronização no processo de fabricação, principalmente em relação ao tempo de coagulação, fermento láctico natural usado, prensagem, teor de sal adicionado e umidade no produto final. Dessa forma é possível encontrar o queijo do Serro com diferentes características físico-químicas e sensoriais (BORELLI *et al.*, 2006; CARDOSO *et al.*, 2013, PINTO *et al.*, 2009).

O QMA do Serro é produzido com leite de vaca cru, recém-ordenhado com adição de fermento láctico natural e coalho líquido industrial. Tradicionalmente, utiliza-se como fermento o “pingo” que é obtido a partir do soro salgado e fermentado coletado no final da dessoragem do queijo produzidos no dia anterior (PERIN *et al.* 2017; IPHAN, 2014). Contudo, mais recentemente os produtores de queijo do Serro passaram a utilizar também um outro tipo de fermento endógeno denominado “rala”, que é o próprio queijo artesanal, com até 8 dias de maturação, ralado. Embora o uso da “rala” seja corriqueiro na região, não faz parte do modo de fazer tradicional do queijo do Serro (BRUMADO, 2016).

Após a adição do coalho e fermento láctico natural acontece o corte da massa em aproximadamente 40 a 60 minutos após a adição destes ao leite. A massa é então colocada em formas plásticas onde acontece a dessoragem do queijo. Sal grosso é acrescentado à superfície do queijo e permanece por 6 a 12 horas. Em seguida o queijo é lavado e virado e colocado sal grosso na outra face e permanece por 12 horas. Após este período o queijo é retirado da forma e lavado e colocado para maturar. É possível encontrar o queijo na versão fresca ou maturada (CARDOSO *et al.*, 2013; IPHAN, 2014).

A percepção sensorial é um componente essencial na escolha de um alimento pelo consumidor (DRAKE, 2007). O processo de maturação representa papel significativo na qualidade e aceitação do queijo, pois é nesta fase que ocorre a formação do sabor do queijo, sendo assim, a forma como o queijo é produzido, a composição do leite, e as reações bioquímicas irão influenciar a qualidade final do produto (CHEN e IRUDAYARAJ 1998;

POVEDA e CABEZAS, 2006, SHIOTA *et al.*, 2015). Pela legislação brasileira (BRASIL, 2017), os queijos de leite cru só podem ser comercializados após a maturação por um mínimo de 60 dias a uma temperatura superior a 5°C, já a legislação estadual de Minas Gerais define um período mínimo de 17 dias para queijos da região do Serro maturados a temperatura ambiente (MINAS GERAIS, 2013).

Muitos estudos foram desenvolvidos com o objetivo de estabelecer parâmetros microbiológicos e físico-químicos do QMA do Serro (BRANT, FONSECA E SILVA. 2007; PINTO *et al.*, 2009, 2011, FIGUEIREDO *et al.*, 2015; MARTINS *et al.*, 2015; CARDOSO *et al.*, 2013; 2015, SANTOS *et al.*, 2017, PERIN *et al.*, 2017). Contudo, estudos publicados que envolvem avaliação sensorial do QMA do Serro são escassos, especialmente os que investigam aceitação em diferentes condições de maturação. Sendo assim é de suma importância analisar o perfil sensorial destes queijos a fim de levantar informações válidas sobre aspectos que influenciam a aceitação do mesmo.

Considerando-se o exposto, esta pesquisa foi realizada com o objetivo de se avaliar a influência do período de maturação nas propriedades físico-químicas e na aceitação de queijos produzidos com fermentos lácticos endógenos distintos e maturados em diferentes condições, simulando as práticas comerciais e requisitos normativos.

2. Metodologia:

2.1 Aquisição e maturação das amostras de queijo:

Todas as amostras (48) de queijos foram adquiridas de dois produtores da microrregião do Serro, registrados no Instituto Mineiro de Agropecuária (IMA). Os dois produtores foram selecionados, aleatoriamente, dentre aqueles que produzem um mínimo de 20 unidades de queijo por lote, sendo um entre os que utilizam o fermento endógeno “pingo” e o outro entre os que utilizam o fermento “rala”. Das 48 amostras coletadas, metade foram produzidas com “pingo” e a outra metade com “rala”, todas do mesmo lote por produtor.

Após dois dias de produzidos, os queijos de cada produtor foram transportados até o centro de distribuição de queijo artesanal da Cooperativa de Produtores Rurais do Serro (CooperSerro), divididas e armazenadas em duas condições diferentes de maturação: metade foi embalada, individualmente, a vácuo em filme plástico flexível termo encolhível e mantidas a 8°C, e a outra condição foi não embaladas, armazenadas sobre tábuas de madeira e

mantido à temperatura e umidade ambiente em uma sala específica para maturação de queijo. Na condição de temperatura ambiente, os queijos foram lavados com água potável e virados a cada dois dias.

Na véspera ou no dia da avaliação sensorial, as amostras foram transportadas em caixas isotérmicas até o laboratório de análise sensorial do Departamento de Nutrição, mantidas nas mesmas condições de temperatura e analisadas em no máximo 14 horas após o transporte. Todas as amostras foram servidas na temperatura ambiente. Os queijos foram avaliados com 3, 10, 17, 24 e 31 dias de maturação. A temperatura e umidade relativa ambiente de maturação dos queijos foi aferida por meio de um registrador de temperatura tipo datalogger (Onset, USA), com medidas efetuadas a cada hora.

2.2 Análise Sensorial do Queijo Minas Artesanal do Serro

Foi utilizado o teste sensorial afetivo de aceitação pela escala hedônica verbal estruturada de 9 pontos cujos extremos correspondem a desgostei extremamente (1) e gostei extremamente (9), conforme a norma NBR 14141 (ABNT,1998). A intenção de compra foi avaliada utilizando uma escala de 5 pontos, variando de definitivamente não compraria (1) a definitivamente compraria (5). Foram utilizados nestes testes, aproximadamente 10 g de cada amostra de queijo artesanal, nos períodos 3, 10, 17, 24, 31 dias de maturação, cortados em pedaços de, aproximadamente, 2x2x1 cm e colocados em pratos descartáveis codificados com números aleatórios de 3 dígitos, totalizando 5 sessões de avaliação sensorial. As amostras foram servidas à temperatura ambiente, de forma monádica e sequencial, em cabines individuais, longe de ruídos e odores. Também, foram oferecidos biscoitos do tipo “água e sal” e água para limpeza do palato entre as avaliações das diferentes amostras. Os testes foram realizados no laboratório de Análise Sensorial, do Departamento de Nutrição, da Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri. Os julgadores assinaram e receberam uma cópia do termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE). A realização da pesquisa foi aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa constituindo o número do parecer 2.296.343.

2.3 Análises físico-químicas

Porções de 5g de queijo foram separadas em triplicata para a realização das análises físico-químicas de acordo com Pereira *et al.* (2001). A determinação do pH dos queijos foi medida utilizando o peagâmetro de bancada digital, BEL Engineering®, Itália, modelo pH

38w) acoplado com eletrodo de imersão, previamente calibrado. O teor de umidade foi feito por gravimetria em estufa regulada a 50°C procedendo-se pesagens até peso constante. O resíduo mineral fixo foi obtido por incineração de frações das amostras de queijo em forno tipo mufla a 500°C. O porcentual de cloreto de sódio foi efetuado pelo doseamento no resíduo mineral (cinzas), seguido pela titulação da reação do nitrato de prata com os cloretos em presença de cromato de potássio, até viragem característica. A acidez foi realizada através da titulação utilizando solução alcalina de hidróxido de sódio 0,1 mol/L em presença de fenolftaleína, sendo os resultados expressos em teor de ácido láctico. Umidade, resíduo mineral fixo, pH, acidez, teor de cloreto de sódio foram analisadas nos tempos 3,10,17, 24 e 31 dias de maturação.

2.4 Delineamento experimental e análise dos resultados

Os resultados foram analisados por meio de métodos de estatística univariada e multivariada utilizando os softwares SAS® University Edition (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA) e Microsoft® Excel 2013 (Microsoft Corporation). A pesquisa foi delineada em esquema fatorial em parcela subdividida, tendo os fatores fermento endógeno (em dois níveis) e condição de maturação (em dois níveis) na parcela e o tempo de maturação na subparcela (em cinco níveis). Os dados de aceitação foram analisados por meio de Análise de Variância em modelo de efeito misto, considerando os julgadores como efeito aleatório aninhados no tempo, enquanto que fermento, condição de maturação e tempo foram considerados efeitos fixos. A variância foi estimada pelo método de Máxima Verossimilhança Restrita (REML), para estimar os graus de liberdade dos efeitos fixos foi utilizado aproximação de Kenward-Roger. A normalidade e independência dos resíduos, homogeneidade de variância foram avaliada por meio do testes de Shapiro-Wilk, Durbin-Watson e Levene, respectivamente. Os escores de aceitação em função do tempo foram avaliados por meio de regressão linear, tendo como critérios para avaliação a falta de ajuste do modelo e a significância dos parâmetros do modelo. Para as variáveis que os pressupostos não foram atendidos realizou-se uma análise não paramétrica correspondente. O nível de significância estatística considerando, em todas as comparações, foi de até 5%.

Os dados de aceitação também foram submetidos à análise de componentes principais a partir da matriz de covariâncias para determinar o mapa de preferência interno expresso em gráfico (biplot) de dispersão dos tratamentos e das correlações dos dados de cada julgador com os escores dos componentes principais.

3. Resultados e Discussão:

O teste de aceitação foi realizado em cinco sessões totalizando 301 julgadores não treinados, mas consumidores habituais de queijo, composto por 72% de mulheres e 28% de homens com média de idade de 27 anos, 68% eram estudantes de graduação, 22% profissionais com ensino superior e 9% pertenciam ao setor de serviços gerais (vigia, braçal, faxineira, segurança) (Tabela 1). Percebe-se que a proporção de gênero não alterou significativamente ($p>0,05$) entre as sessões de avaliação sensorial, apesar da grande maioria dos julgadores não serem os mesmos entre os dias de análise, pois menos de 15 julgadores participaram da avaliação em todos os tempos. A proporção das faixas etárias também não oscilou significativamente entre os dias de avaliação ($p>0,05$) (Tabela 1). Os julgadores foram predominantes do gênero feminino, com idade entre 18 a 25 anos e estudantes do ensino superior.

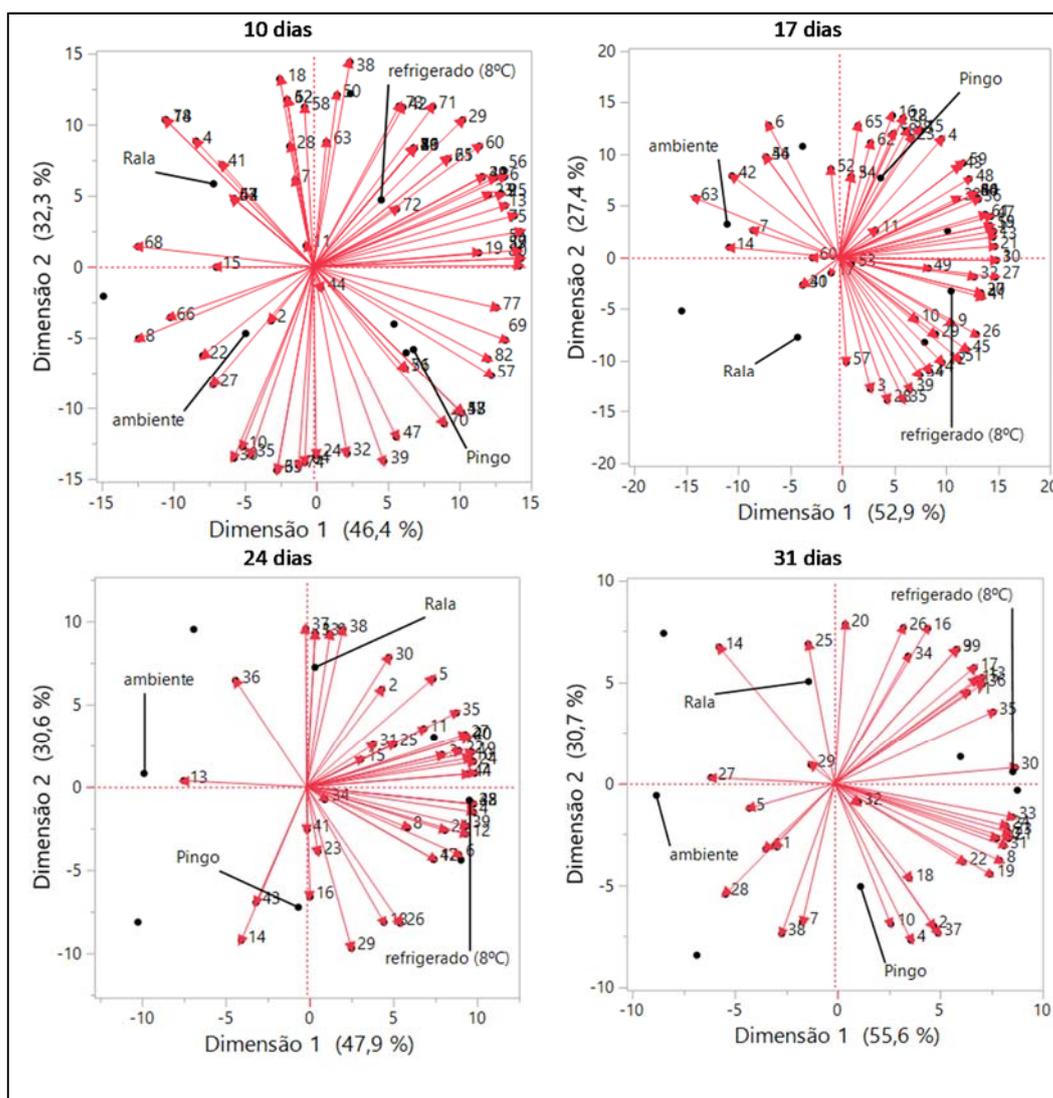
Tabela 1. Informações demográficas dos julgadores.

Gênero	Tempo de maturação (dias)					Valor de P
	3 (n=70)	10 (n=82)	17 (n=65)	24 (n=45)	31 (n=40)	
Feminino (n=217)	55 (78,6%)	55 (67,1%)	46 (71,9%)	32 (71,1%)	29 (72,5%)	0,642*
Masculino (n=84)	15 (21,4%)	27 (32,9%)	18 (28,1%)	13 (28,9%)	11 (27,5%)	
Idade (anos)	24***	23	25	22	26	0,08**
18-20	16 (22,9%)	16 (19,5%)	11 (16,9%)	11 (24,4%)	9 (22,5%)	0,215*
21-25	26 (37,1%)	41 (50%)	24 (36,9%)	25 (55,6%)	11 (27,5%)	
26-35	16 (22,9%)	15 (18,3%)	16 (24,6%)	6 (13,3%)	12 (30%)	
35 +	12 (17,1%)	10 (12,2%)	14 (21,5%)	3 (6,7%)	8 (20%)	

* teste de qui-quadrado; ** teste de Kruskal-Wallis; *** Mediana

O mapa de preferência interno (Figura 1) mostra uma nítida segmentação do tipo de fermento e das condições de maturação em relação à aceitação sensorial por parte dos julgadores. Ao longo da maturação, a maioria dos consumidores demonstraram preferências pelos queijos maturados embalado em temperatura controlada (8°C) em relação à maturação em temperatura ambiente. Já os fermentos, situaram-se em quadrantes opostos e nos dois últimos períodos de maturação avaliados (24 e 31 dias), dividiram a preferência do consumidor de forma mais equitativa.

Figura 1- Mapa de preferência interno, obtido a partir das componentes principais sobre a matriz de covariância, dos dados de aceitação dos consumidores de queijos minas artesanais do Serro produzidos com diferentes fermentos e maturados em diferentes condições em quatro tempos de maturação. As setas representam os julgadores.



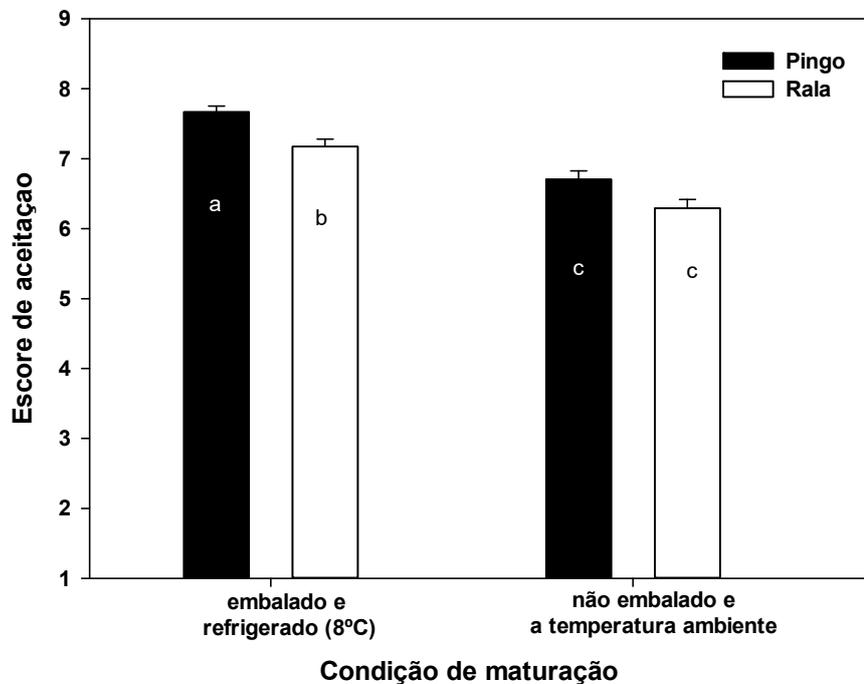
A Tabela 2 apresenta os resultados da Análise de Variância para os efeitos fixos e suas interações. Somente as interações entre tipo de fermento e tempo de maturação e entre condição e tempo de maturação foram significativas. Os resultados do mapa de preferência corroboram com os resultados da análise de variância (Figuras 2, 3 e 4).

Tabela 2. ANOVA do modelo misto para escore sensorial de aceitação das amostras que queijo minas artesanal do Serro.

Fonte de Variação	GL	GL		Valor F	Valor-P
		GL	Denominador		
Fermento	1	297	297	13,06	0
Maturação	1	297	297	125,74	0
Fermento*Maturação	1	297	297	1,05	0,306
Tempo	4	297	297	7,98	0
Fermento*Tempo	4	297	297	4,14	0,003
Maturação*Tempo	4	297	297	12,09	0
Fermento*Maturação*Tempo	4	297	297	1,5	0,203

Em relação à aceitação dos queijos durante os 31 dias de maturação, os queijos produzidos com “pingo” e “rala” armazenados a temperatura controlada (8°C) tiveram maior aceitação (escore médio de 7,7 e 7,2, respectivamente), que os queijos maturados a temperatura ambiente, que receberam escores entre 6,7 e 6,3, respectivamente (Figura 2).

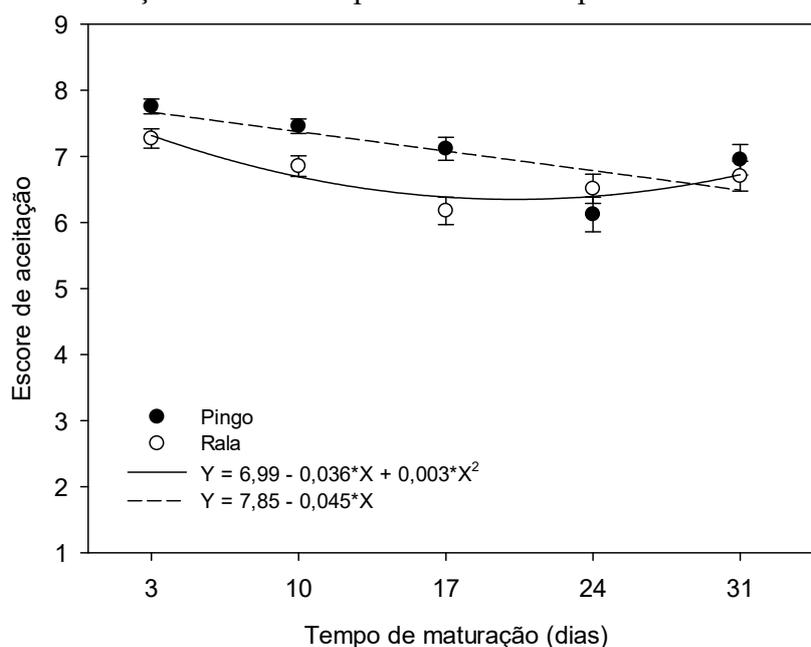
Figura 2- Aceitação sensorial do QMA do Serro produzido com diferentes fermentos endógenos e distintas condições de maturação: refrigerado embalado e ambiente não embalado. Colunas com mesma letra não diferem ($p>0,05$) pelo teste de Tukey.



Observa-se diferença significativa ($p < 0,05$) entre os valores de aceitação dos queijos fabricados com “pingo” e “rala” armazenados embalados a 8° C, já na maturação a temperatura ambiente, os escores sensoriais foram menores e não foi detectado diferença significativa entre os tipos de fermento (Figura 2).

A aceitação sensorial nos primeiros 17 dias de maturação foi maior para os queijos produzidos com o fermento “pingo” do que para os queijos de “rala” (Figura 3). Contudo, no 31° dia de maturação a aceitação foi, estatisticamente, a mesma. Esse resultado mostra que a diferença de aceitação entre os queijos fabricados com “pingo” e “rala” existiu somente nos primeiros 30 dias de maturação, independentemente da condição de maturação estudada.

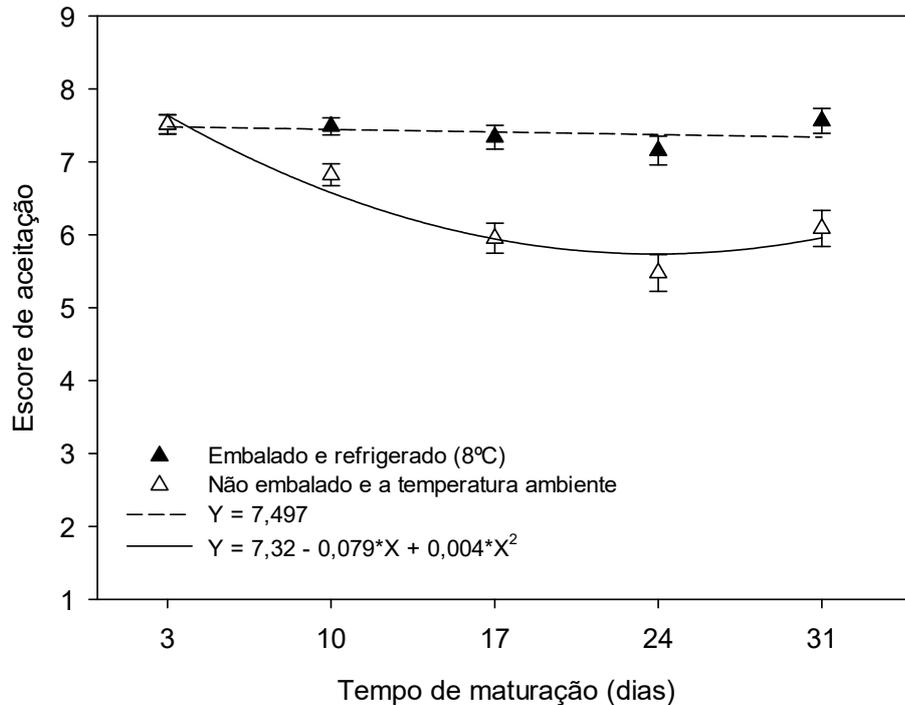
Figura 3- Aceitação sensorial de queijos produzidos com diferentes tipos de fermento em função do tempo de maturação. As barras representam o erro padrão da média.



Dentre estudos com valores hedônicos de aceitação próximos ao presente estudo em queijo minas artesanal tem-se a pesquisa realizada por Machado *et al.* (2004) com queijo do Serro, maturado por 6 dias, que recebeu escore médio de aceitação de 6,03, considerado como gostei ligeiramente. Para o autor esta aceitação foi considerada baixa, já que o queijo do Serro é reconhecido pela sua boa aceitação no mercado. Bemfeito *et al.* (2016) analisou a aceitação do queijo minas artesanal da Canastra, com 22 a 25 dias, e encontrou escores médios ente 6 (gostei ligeiramente) e 7 (gostei moderadamente) para os atributos textura e sabor avaliados.

A maturação realizada com queijo embalado sob temperatura controlada (8°C) apresentou o mesmo escore de aceitação ao longo do tempo. Devido ao fato de terem sido maturados embalados não houve perda considerável de umidade e nem formação de costa amarelada, apresentando-se visualmente como queijos mais frescos e, dessa forma, escores médios de 7 pontos se mantiveram estáveis no período de maturação avaliado. Entretanto, no queijo maturado não embalado a temperatura ambiente foi observada uma diminuição na pontuação hedônica, possivelmente devido influência da temperatura mais elevada na aceleração do processo de maturação dos queijos (Figura 4).

Figura 4- Aceitação sensorial de queijos maturados em diferentes condições de maturação em função do tempo. As barras representam o erro padrão da média.



Alguns resultados referentes à aceitação ao longo do processo de maturação apresentados na literatura, com queijos armazenados a temperatura ambiente confirmam os resultados obtidos neste trabalho. Lima *et al.* (2008), Resende (2014) e Pereira *et al.* (2017) analisaram a aceitação de queijos artesanais, durante o período de maturação de 30, 60 e 120 dias, respectivamente, e observaram uma relação inversa entre escores de aceitação e maior período de maturação. Desta forma, sugere-se que os consumidores preferiram queijos com aparência de mais frescos e com características sensoriais suaves, podendo ser explicado pelo hábito frequente de consumo da população para queijos mais frescos ou pelo fato de ser uma

particularidade do grupo de julgadores participantes da pesquisa que preferiram queijos mais frescos em detrimento aos maturados.

No entanto em pesquisas realizadas em outros países avaliando a aceitação de queijos artesanais, produzidos com leite cru, foi verificada uma correlação positiva entre os atributos sensoriais e índice de maturação nos queijos, indicando que a preferência dos consumidores foi direcionada a queijos com um tempo maior de maturação. (HERNÁNDEZ-MORÁLEZ *et al.* 2010; SANTILLO *et al.* 2012 e DIEZHANDINO *et al.* 2016).

Nas primeiras semanas de análise (queijos com até 10 dias de maturação), os comentários dos participantes em relação aos queijos se restringiram a sabor salgado, ácido, azedo e aparência e textura adequadas. Porém nos queijos maturados por 17, 24 e 31 dias prevaleceram os comentários em relação a sabor muito forte, muito amargo, sabor desagradável, gosto ruim, cheiro forte, aparência estranha, textura seca e esfarelando.

Resultados semelhantes a esta pesquisa, foram encontrados por Freitas-Sá, Mattos e Monteiro (2016) em queijo do Serro, os autores constataram que queijos com até 13 dias de maturação foram descritos como tendo aparência úmida e consistência compacta; cor branca amarelada; sabor e aroma suave, ligeiramente ácido, porém queijos com maturação por mais de 13 dias apresentaram cor amarelo escuro e aparência ressecada, surgimento de características marcantes de aroma, sabores mais intensos, acidez característica e aparecimento do gosto amargo.

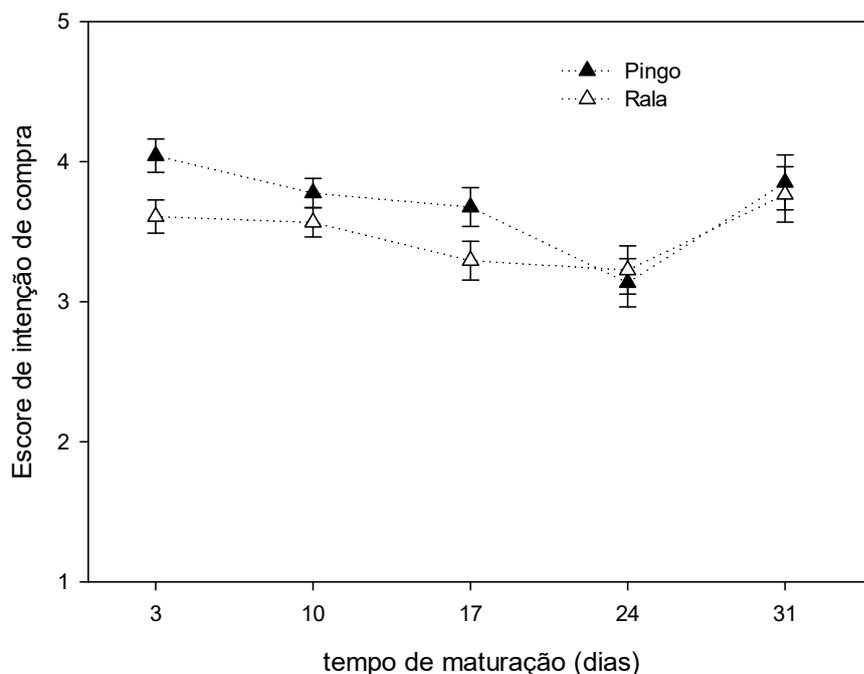
No geral os queijos produzidos maturados a temperatura ambiente, independentemente do fermento utilizado (rala ou pingo), receberam mais comentários negativos em relação a sabor, consistência e aparência. Entre os comentários, a descrição de sabor amargo foi a mais prevalente, principalmente nos queijos produzidos com rala. O sabor amargo em queijos se deve a acúmulo de peptídeos hidrofóbicos e amargos, formados durante a fabricação e maturação dos queijos, devido a uma proteólise primária e secundária desequilibrada. Temperaturas mais elevadas aceleram o processo de maturação e conseqüentemente a formação de peptídeos e aparecimento do sabor amargo mais acentuado (FALLICO *et al.*, 2005).

A intenção de compra obteve o mesmo perfil de resposta que a aceitação sensorial para as condições avaliadas (Figura 5). Os queijos produzidos com pingo apresentaram

escores médios de intenção de compra (3,69) maiores que os produzidos com rala (3,49). A intenção de compra se diferiu estatisticamente ($p < 0,05$) nestes fermentos lácticos avaliados.

As pontuações médias de intenção de compra dos queijos (Figuras 5 e 6) produzidos com rala (3,68) e maturados em temperatura controlada (8°C) e os produzidos com rala (3,02) e pingo (3,12) a temperatura ambiente, se situaram no escore 3, correspondendo a talvez compraria/ talvez não compraria. Já os queijos produzidos com pingo (4,04) e armazenados em refrigeração receberam pontuação média no escore 4 correspondendo a provavelmente compraria.

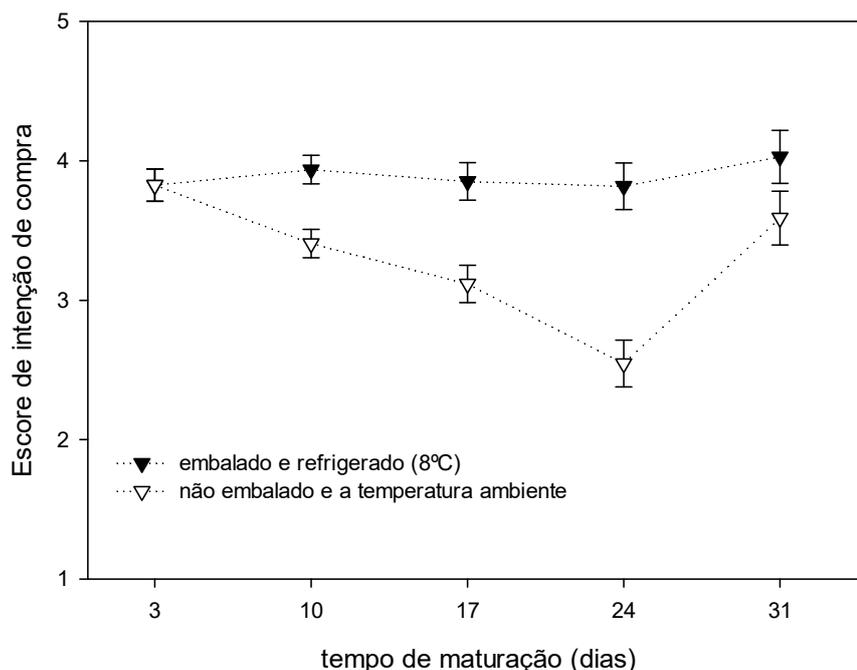
Figura 5- Intenção de compra de queijos produzidos com diferentes tipos de fermento em função do tempo de maturação. As barras representam o erro padrão da média



O período de maturação, temperatura e condições de armazenamento interferiram significativamente ($p < 0,05$), a partir dos 10 dias de maturação, na intenção de compra do queijo. Pode-se observar (Figura 6) que maiores escores se deram nos queijos mais frescos, da mesma forma as amostras maturadas a temperatura de refrigeração receberam maiores escores de aceitação e intenção de compra, corroborando com os resultados apresentados por Pereira *et al.* (2017) verificaram menores pontuações em relação a intenção de compra em queijos mais maturados. Resende *et al.* (2014) constataram maiores escores de intenção de compra em

queijos mais frescos, não havendo interferência do período de maturação na decisão dos consumidores.

Figura 6- Intenção de compra de queijos maturados em diferentes condições de maturação em função do tempo. As barras representam o erro padrão da média.



Os queijos feitos com pingo e maturados em temperatura controlada obtiveram maiores valores médios hedônicos na escala de aceitação e maiores escores na escala de intenção de compra (Figuras 5 e 6). Da mesma forma Oliveira *et al.* (2016) avaliando a aceitação e intenção de compra do queijo minas frescal observou maiores escores de intenção de compra (provavelmente compraria) em relação aos queijos com maiores pontuações de aceitação. Esse resultado corrobora com a preferência dos avaliadores indicada no teste de aceitação.

Não houve diferença significativa no pH dos queijos produzidos com pingo e rala ($p > 0,05$), mas o pH diferiu entre os queijos maturados a temperatura controlada (8°C) e a temperatura ambiente ($p = 0,002$), com menor valor de pH para os queijos maturados a 8°C . A variação de pH ao longo do tempo também foi significativa ($p < 0,03$), com redução ao longo do tempo (Tabela 3). Diferentemente desse estudo, Martins *et al.* (2015), Figueiredo *et al.* (2015) e Pinto *et al.* (2011) constataram aumento do pH do QMA do Serro, durante o período de maturação. Brumado (2016) também constatou aumento do pH durante a maturação sem

interferência do tipo de fermento utilizado, para queijos produzidos com rala (4,99 para 5,57) e pingo (5,07 para 5,44).

Em relação à acidez titulável, (Tabela 3) a variação apresentada não foi estatisticamente significativa ($p > 0,05$) para todas as variáveis estudadas: fermento, condição e tempo de maturação, apesar de observar uma diminuição na média da acidez ao longo do tempo. Esse resultado corrobora com o de Martins *et al.* (2015), que constatou que a acidez do queijo do Serro não foi afetada pela temperatura e ou período de maturação. Diferentemente, nos queijos pesquisados por Brumado (2016) houve aumento da acidez ao longo dos 60 dias de maturação, tanto para queijos produzidos com rala e pingo.

O aumento na acidez ao longo da maturação decorre da fermentação da lactose por bactérias *starters*. A maior acidez apresentada nos queijos produzidos com pingo se deve a predominância de bactérias *starters* presentes neste fermento natural, ocasionando maior produção de ácido láctico (LAVASANI *et al.*, 2011, BRUMADO, 2016).

Pode-se observar médias maiores de acidez no tempo 3 e 10 dias para queijos produzidos com pingo e rala e maturados sob temperatura controlada (8°C), esse maior teor de acidez foi identificado e relatado pela maioria dos julgadores durante a análise sensorial dos queijos.

Houve diminuição do teor de umidade ao longo do tempo nos queijos maturados a temperatura ambiente ($p < 0,05$), mas não foi observado variação significativa para os queijos maturados a temperatura de 8°C ou para o tipo de fermento (Tabela 3). Resultado previsível pelo fato da maturação a temperatura ambiente ocorrer com os queijos sem embalagem, ao contrário dos queijos maturados em temperatura de 8 °C que mantiveram seu teor de umidade devido à barreira da embalagem plástica. Resultados semelhantes foram obtidos por Machado *et al.* (2004); Martins *et al.* (2015), Brumado (2016) e Figueiredo (2015).

A resolução nº 7 de 28 de novembro de 2000 classifica o QMA do Serro como média umidade (36 a 45,9g/100g). Os queijos maturados em refrigeração em ambos os fermentos apresentaram valores médios dentro dessa faixa estabelecida, não havendo grandes variações nos valores durante a maturação, sendo classificados como média umidade. Já os queijos maturados a temperatura ambiente aos 10 dias apresentaram valores médios de 47,31 (rala) e 48,61 (pingo) classificados como alta umidade, porém no decorrer da maturação estes valores médios diminuíram, para 32,05 no queijo produzido como pingo, sendo classificado então como baixa umidade de acordo com a Portaria nº 146 de 07 de março de 1996.

O teor de cloreto de sódio se mostrou variável entre os tempos e condições de maturação e teor de umidade apresentado pelo queijo (Tabela 3). Tal fato se justifica pelo tipo de salga praticado pelos produtores de queijo do Serro ser realizada de forma manual, sem padronização da quantidade de sal adicionado. De forma geral os queijos produzidos com rala independentemente das condições de maturação apresentaram maiores teores de cloreto de sódio, sendo confirmado pelos comentários realizados pelos julgadores que consideraram o queijo produzido com rala mais salgado que o queijo produzido com pingo. Contudo, essa variação no teor de cloreto não foi estatisticamente significativa para todas as variáveis estudadas ($p>0,05$).

Tabela 3- Média da acidez titulável (% ácido láctico), de pH e percentual médio de cloreto de sódio, umidade e resíduo mineral fixo nas amostras de queijo produzidas com pingo e rala e maturadas em temperatura controlada (8°) e temperatura ambiente ao longo de 31 dias.

Parâmetro	Fermento	Maturação	Tempo de maturação (dias)				
			3	10	17	24	31
Ph	Rala	Refrigerada (8°C)		4,8	4,9	4,9	4,8
	Pingo	Refrigerada (8°C)		4,9	4,8	4,8	4,7
	Rala	Ambiente	5	5,2	5,1	5,1	4,8
	Pingo	Ambiente	5	5,3	5,3	5	5
Acidez (% de ácido láctico)	Rala	Refrigerada (8°C)		0,61	0,56	0,46	0,32
	Pingo	Refrigerada (8°C)		0,56	0,29	0,55	0,49
	Rala	Ambiente	0,62	0,48	0,36	0,69	0,36
	Pingo	Ambiente	0,63	0,32	0,34	0,54	0,46
Umidade (%)	Rala	Refrigerada (8°C)		44,35	41,41	41,9	41,93
	Pingo	Refrigerada (8°C)		43,68	43,3	43,33	42,85
	Rala	Ambiente		47,31	43,5	38	37,64
	Pingo	Ambiente		48,61	45,82	41,94	32,05
Cloreto de sódio (%)	Rala	Refrigerada (8°C)		1,18	2,14	1,86	1,11
	Pingo	Refrigerada (8°C)		1,37	0,99	1,76	1,36
	Rala	Ambiente	2,29	1,44	1,33	1,93	2,56
	Pingo	Ambiente	1,59	1,42	2,28	1,15	1,45
Cinzas (%)	Rala	Refrigerada (8°C)		5,91	6,52	8,51	5,49
	Pingo	Refrigerada (8°C)		6,67	5,85	6,07	5,47
	Rala	Ambiente	5,77	7,5	6,43	6,17	8,13
	Pingo	Ambiente	7,55	6,01	8,15	7,14	5,07

O resíduo mineral fixo representa os elementos não orgânicos presentes no alimento. Entre os sais encontrados nos queijos temos cálcio, fosfatos e cloreto de sódio adicionado. Os

teores de resíduo mineral fixo variaram de 5,07 a 8,51 % sendo a média dos queijos produzidos com pingo 6,44% e os queijos produzidos com rala 6,71%. Valores inferiores de resíduo mineral fixo em queijo do Serro foram encontrados por Machado *et al.* (2004) e Figueiredo (2014), os teores médios se situaram na faixa de 3,79% e 3,72% respectivamente.

Este maior teor de resíduo mineral fixo encontrado no trabalho pode estar relacionado com o conteúdo de cloreto de sódio adicionado durante a fabricação do queijo (FIGUEIREDO, 2006), ou à alimentação que o animal foi submetido, pois a complementação alimentar baseada em rações que geralmente, são ricas em proteínas e minerais pode proporcionar ao queijo um alto teor de minerais (OLIVEIRA, 2011).

Conclusão:

Conclui-se que as condições de maturação e tipo de fermento utilizado na produção do queijo influenciam sua aceitação pelos consumidores, que foram predominantemente jovens e do gênero feminino.

A aceitação dos queijos ao longo do período de maturação foi menor naqueles maturados na condição não embalado e a temperatura ambiente do que nos queijos maturados embalados e mantidos a 8°C. Em relação ao tipo de fermento, os queijos produzidos com pingo apresentaram maior aceitação que os queijos produzidos com rala, sendo que a diferença na aceitação deixou de existir aos 30 dias de maturação.

A intenção de compra obteve, para as condições avaliadas, o mesmo perfil de resposta que a aceitação sensorial. Os queijos produzidos com pingo apresentaram escores médios de intenção de compra maiores que os produzidos com rala. Maiores escores se deram nos queijos mais frescos, da mesma forma nas amostras maturadas à temperatura de 8°C.

Nas características físico-químicas, apenas pH e umidade variaram significativamente em função da condição e do tempo de maturação, mas não em relação ao fermento utilizado.

Referências:

- ABNT. ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. NBR 14141: escalas utilizadas em análise sensorial de alimentos e bebidas. Rio de Janeiro, 1998. 3p.
- BEMFEITO, R. M. *et al.* Temporal dominance of sensations sensory profile and drivers of liking of artisanal Minas cheese produced in the region of Serra da Canastra, Brazil. **Journal of Dairy Science**, v. 99 n. 10, p 7886–7897, 2016.
- BERTOLINO M. *et al.* Evolution of chemico-physical characteristics during manufacture and ripening of Castelmagno PDO cheese in wintertime. **Food Chemistry**, v.129, n. 3, p. 1001-1011, 2011.
- BORELLI, B. M. *et al.* Enterotoxigenic *Staphylococcus* spp. and other microbial contaminants during production of Canastra cheese, Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 37, p. 545-550, 2006.
- BRANT, L. M. F. *et al.* Microbiological quality of artisanal Minas cheese, manufactured in the region of Serro-MG. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 59, p. 1570–1574, 2007.
- BRASIL. Portaria n. 146, de 07 de março de 1996. Regulamentos Técnicos de Identidade e Qualidade dos Produtos Lácteos. Ministério da Agricultura e do Abastecimento. Secretaria Nacional de Inspeção de Produtos de Origem Animal. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 11 mar. 1996.
- BRASIL. Resolução n. 7, de 28 de novembro de 2000. Critérios de Funcionamento e de Controle da Produção de Queijarias, para seu relacionamento junto ao Serviço de Inspeção Federal. Ministério da Agricultura e do Abastecimento. Secretaria Nacional de Inspeção de Produtos de Origem Animal. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 02 jan. 2001.
- BRUMADO, E. C. C. **Impacto do tipo de fermento endógeno na qualidade e tempo de maturação de queijo minas artesanal produzido em propriedades cadastradas pelo IMA (Instituto Mineiro de Agropecuária) na região do Serro-MG**, 2016, 158 p. Tese (Doutorado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Minas Gerais, 2016.
- BRUNO, L. M. *et al.* Wild lactobacillus strains: Technological characterisation and design of Coalho cheese lactic culture. **International Journal of Dairy Technology**, v. 70 n. 4, p. 572-582, 2017.
- CARDOSO, V. M. *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, n. 3, p. 743-749, 2013.
- CARDOSO V. M. *et al.* The influence of seasons and ripening time on yeast communities of a traditional Brazilian cheese. **Food Research International**, v.69, p. 331–340, 2015.
- CHEN M, IRUDAYARAJ J. Sampling technique for cheese analysis by FTIR spectroscopy. **Journal of Food Science**, v. 63, n.1, p. 96–9, 1998.

- DIEZHANDINO, I. *et al.* Rheological, textural, colour and sensory characteristics of a Spanish blue cheese (Valdeón cheese). **LWT - Food Science and Technology**, v.65, p. 1118-1125, 2016.
- DRAKE, M. A. Invited review: sensory analysis of dairy foods. **Journal of Dairy Science**, v.90, n. 49, p.25-37, 2007.
- FALLICO, V. Evaluation of Bitterness in Ragusano Cheese. **Journal of Dairy Science**, v. 88, n. 4, p. 1288-1300, 2005.
- FARIA, A. C. S. *et al.* Viable *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* in retail artisanal Coalho cheese from northeastern Brazil. **Journal of Dairy Science**, v. 97, p. 4111–4114, 2014.
- FIGUEIREDO, S. P. *et al.* Características do leite cru e do queijo minas artesanal em diferentes meses. **Archives of Veterinary Science**, v. 20, n. 1, p. 68-82, 2015.
- FREITAS-SÁ, D. G. C.; MATTOS, C. T. G. B.; MONTEIRO, R. P. Descrição sensorial do queijo do Serro: uma contribuição para definição do período de maturação dos queijos artesanais. In XXV Congresso Brasileiro de Ciência e Tecnologia de Alimentos: **Alimentação a arvore que sustenta a vida**. Gramado, 2016
- HERNÁNDEZ-MORALES, C. *et al.* Physicochemical, microbiological, textural and sensory characterisation of Mexican Anejo cheese. **International Journal of Dairy Technology**, v. 63, n. 4, 2010.
- IMA. INSTITUTO MINEIRO DE AGROPECUÁRIA. Queijo minas artesanal. Disponível em: <<http://www.ima.mg.gov.br/queijo-minas-artesanal>>. Acesso em: 12/04/2018.
- IPHAN. INSTITUTO DO PATRIMÔNIO HISTÓRICO E ARTÍSTICO NACIONAL. **Dossiê IPHAN: Modo artesanal de fazer queijo de Minas: Serro, Serra da Canastra e Serra do Salitre /Alto Paranaíba**. Brasília, Distrito Federal, 2014.
- LAVASANI, A. R. S. *et al.* Changes in physicochemical and organoleptic properties of traditional Iranian cheese Lighvan during ripening. **International Journal of Dairy Technology**, v.65, n.1, p.64-70, 2011.
- LIMA, C. D. C. *et al.* Microbiological, physical- chemical and sensory evaluation of a traditional Brazilian cheese during the ripening process. **World Journal Microbiology Biotechnology**, v. 24 p. 2389-2395, 2008.
- MACHADO, E. C. *et al.* Physico-chemical and sensorial properties of artisanal Minas cheese produced in the region of Serro, Minas Gerais. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 24, p. 516–521, 2004.
- MARTINS, J. M. *et al.* Determining the minimum ripening time of artisanal Minas cheese, a traditional Brazilian cheese. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 46, n. 1, p. 219-230, 2015.

OLIVEIRA, K. A. M. *et al.* Avaliação físico-química, microbiológica e sensorial de queijo minas frescal de leite de cabra desenvolvido por acidificação direta e fermentação láctica.

Revista Instituto Laticínios Cândido Tostes, v. 71, n. 3, p. 166-178, 2016.

PEREIRA, D. B. C., SILVA, P. H. F., DE OLIVEIRA, L. L., COSTA JUNIOR, L. C. G. C. Físico-química do leite e derivados – Métodos analíticos. In: PEREIRA, D. B. C., SILVA, P. H. F., DE OLIVEIRA, L. L., COSTA JUNIOR, L. C. G. C (2 Ed.) **Queijo**. Juiz de Fora: EPAMIG, 2001. Cap. 5, p. 109-137.

PEREIRA, E. A. *et al.* Acceptance of Santo Giorno cheese typical of the Southwestern region of Paraná, Brazil. **Ciência Rural**, v.47, n. 04, 2017.

PERIN, L. M. *et al.* Bacterial ecology of artisanal Minas cheeses assessed by culture dependent and –independent methods. **Food Microbiology**, v. 65, p. 160–169, 2017.

PINTO, M. S. **Diagnóstico socioeconômico, cultural e avaliação dos parâmetros físico-químicos e microbiológicos do queijo minas artesanal do Serro**. 2004, 123 p. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Minas Gerais. 2004.

PINTO, M. S. *et al.* Survival of *Listeria innocua* in Minas Traditional Serro cheese during ripening. **Food Control**, v. 20, p. 1167–1170, 2009.

PINTO, M. S. *et al.* The effects of Nisin on *Staphylococcus aureus* count and the physicochemical properties of Traditional Minas Serro cheese. **International Dairy Journal**, v.21, p. 90–96, 2011.

POVEDA, J. M., e CABEZAS, L. Free fatty acid composition of regionally produced Spanish goat cheese and relationship with sensory characteristics. **Food Chemistry**, v. 95, p. 307-311, 2006.

RESENDE, E. C. **Aspectos sensoriais e microbiológicos do queijo Minas artesanal da Microrregião Campo das Vertentes**. 2014, 114 p. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia do leite e Derivados) - Faculdade de Farmácia e Bioquímica. Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora, Minas Gerais. 2014.

RESENDE, E. C. *et al.* Avaliação da intenção de compra em queijo Minas artesanal da microrregião Campo das Vertentes. **Revista Brasileira de Higiene e Sanidade Animal**, v. 8, n. 5, p. 287-297, 2014.

SANTILLO, A. *et al.* Consumer acceptance and sensory evaluation of Monti Dauni Meridionali Caciocavallo cheese. **Journal of Dairy Science**, v. 95 n. 8, 2012.

SANTOS, L. S. *et al.* Easy classification of traditional Minas cheeses using artificial neural networks and discriminant analysis. **International Journal of Dairy Technology**, v. 70, n. 4 p. 492-498, 2017.

SHIOTA, M. *et al.* Effects of Flavor and Texture on the Sensory Perception of Gouda-Type Cheese Varieties during Ripening Using Multivariate Analysis. **Journal of Food Science**. v. 80, n.12, p. 2740-2750, 2015.

Capítulo 3

Predição do tempo de maturação e de características de qualidade do Queijo Minas Artesanal do Serro por espectroscopia no infravermelho.

Resumo

A espectroscopia no infravermelho vem sendo amplamente utilizada na caracterização e identificação de componentes dos alimentos por ser de análise rápida, sensível e confiável. O objetivo desta pesquisa consistiu em prever o tempo de maturação e o tipo de fermento utilizado na produção do queijo artesanal do Serro por meio de espectros analisados por espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier e refletância total atenuada (FTIR-ATR). Cinquenta amostras de queijo minas artesanal, com diferentes tempos e condições de maturação foram adquiridas e analisadas por FTIR-ATR. Para obtenção dos espectros, as amostras foram cortadas no centro geométrico do queijo e com o auxílio de uma espátula foi extraída uma fração, em formato cúbico de, aproximadamente 1 cm, as quais transferidas diretamente para a superfície do cristal do ATR. Os dados dos perfis espectrais obtidos foram depurados selecionando os valores de transmitância no intervalo 3500-800 cm^{-1} . Foram utilizadas 36 amostras para treinamento e 12 para a etapa de validação do modelo. Os dados foram submetidos a um pré-processamento, aplicando-se derivação pelo método de Savitzky-Golay, auto escalonamento e correção multiplicativa de sinal. Após o pré-processamento, a matriz de dados de calibração foi analisada pelo método de reconhecimento de padrões por PLS-DA para definição do modelo de treinamento. As variáveis avaliadas para escolha do modelo de predição foram o erro total após validação interna (RMSECV), sensibilidade, seletividade, coeficiente de determinação. Os espectros de infravermelho das amostras foram bem definidos, consistentes em cada amostra. O modelo conseguiu classificar de forma satisfatória o tempo de maturação das amostras de queijos em torno dos 17 dias. Contudo, não foi possível classificar de forma satisfatória as amostras de queijos produzidas com os fermentos pingo e rala, apresentando classificação incorreta de três amostras queijo fabricado com pingo. Os resultados evidenciam que técnica FTIR-ATR pode ser uma ferramenta rápida, relativamente barata e simples para prever características de qualidade e tempo de maturação do queijo minas artesanal.

Palavras-chave: FTIR-ATR. Queijo minas artesanal. Maturação. Serro.

Prediction of the ripening time and quality characteristics of Serro Minas Cheese by infrared spectroscopy.

Abstract

Infrared spectroscopy has been widely used for characterization and identification of food components because it is fast, sensitive and reliable. The objective was to predict the ripening time and the type of endogenous culture used in the production of artisanal Minas cheese of the Serro region using chemometric methods and infrared attenuated total reflectance spectroscopy (FTIR-ATR). Fifty cheese samples with different ripening time and produced with two endogenous cultures (pingo and rala) were acquired and analyzed by FTIR-ATR. The spectra were obtained from samples of cheese in the shape of cubes, approximately 1 cm, removed from the geometric center of the cheese. The cubes were placed directly on the surface of the ATR crystal. The data of the spectral profiles obtained were purified by selecting transmittance values in the range 3500-800 cm^{-1} . We used 36 training samples and 12 for the validation of the model. The data were submitted to pre-processing by applying the Savitzky-Golay softening method, autoscale and multiplicative signal correction (MSC). After the pre-processing, the calibration data matrix was analyzed by PLS-DA to define the training model. The variables evaluated to choose the prediction model were RMSECV, sensitivity, selectivity and coefficient of determination.

The model was able to satisfactorily classify the cheese samples in relation to the ripening time (above or below 17 days), which is the minimum period defined by the legislation. However, it was not possible to satisfactorily discriminate the cheese samples in relation to endogenous culture used in production (pingo or rala), showing incorrect classification for three samples of cheese made with pingo. The results demonstrate that the FTIR-ATR technique can be a fast, relatively inexpensive and simple tool to predict quality characteristics and ripening time of the artisanal cheese mines.

Keywords: FTIR-ATR. Artesanal Minas chesse. Ripening. Serro.

1. Introdução:

O processo de maturação do queijo representa uma etapa de diversas transformações físicas, físico-químicas e microbiológicas. A ocorrência dessas numerosas transformações resulta no desenvolvimento de sabores e texturas característicos de cada variedade de queijo. Tais características são a chave para a identidade, qualidade e aceitação dos queijos pelos consumidores (POVEDA e CABEZAS, 2006; MARTINS *et al.*, 2015, SHIOTA *et al.*, 2015).

A proteólise é o evento mais importante que ocorre na maturação, pois é responsável por mudanças na textura e funcionalidade do queijo (McSWEENEY, 2011). Durante a proteólise ocorre a degradação das caseínas em peptídeos e aminoácidos livres. Consequentemente, estes compostos aumentam durante o período de maturação e podem ser usados como indicadores da maturação nos queijos (MOATSOU *et al.*, 2002; PANARI *et al.*, 2003). Porém as metodologias convencionais para a determinação da composição de alimentos utilizam de técnicas laboriosas, consumindo muito tempo e geram resíduos (DOMINGOS *et al.*, 2014; ZIELINSKI *et al.*, 2014).

Nas últimas duas décadas, análises de espectroscopia no infravermelho surgiram como uma ferramenta analítica confiável para a avaliação objetiva de aspectos de qualidade de alimentos. É uma técnica de enorme potencial para a obtenção de informações rápidas sobre a composição química e maturação de queijos (CHEN *et al.*, 2009; MARINHO *et al.*, 2015).

O potencial da espectroscopia na caracterização e monitoração de queijos têm sido objeto de vários estudos entre eles temos os de classificação do queijo de acordo com o período de maturação (MARTIN-DEL-CAMPO *et al.*, 2007; LERMA-GARCIA *et al.*, 2010; GORI *et al.*, 2010; SOTO-BARAJAS *et al.*, 2013; CURRÒ *et al.*, 2017), na predição das qualidades sensoriais do queijo (KAROUI *et al.*, 2004; BLAZQUEZ *et al.*, 2006; KOCAOGLU-VURMA *et al.*, 2009; KRAGGERUD, NAES e ABRAHANSEN, 2014), na avaliação dos componentes físico-químicos durante a maturação (SUBRAMANIAN *et al.*, 2011) na origem geográfica dos queijos (KAROUI *et al.*, 2004; 2005) e até na caracterização da madeira utilizada na maturação do queijo (OULAHAL *et al.*, 2009).

O queijo minas artesanal do Serro é produzido a partir de leite de vaca cru, com adição de coalho industrial líquido e adição do “pingo” ou “rala” (fermentos lácticos naturais). O “pingo” é obtido a partir do soro salgado e fermentado coletado no final da dessoragem do

queijo (PERIN *et al.*, 2017). Enquanto a “rala” é o próprio queijo ralado com até 8 dias de maturação (BRUMADO, 2016). Pela legislação brasileira (BRASIL, 2017), os queijos de leite cru só podem ser comercializados após a maturação por um mínimo de 60 dias a uma temperatura superior a 5°C, já a legislação estadual de Minas Gerais define um período mínimo de 17 dias para queijos da região do Serro maturados a temperatura ambiente (MINAS GERAIS, 2013).

Verifica-se na literatura estudos sobre o processo de maturação no QMA do Serro ligado a análises físico-químicas e microbiológica (MARTINS *et al.*, 2015, PINTO *et al.*, 2009, 2011, CARDOSO *et al.*, 2013; 2015, FIGUEIREDO *et al.*, 2015), entretanto, não há estudos associando a utilização do FTIR-ATR na identificação do período de maturação e composição química do queijo minas artesanal do Serro.

Diante do exposto o objetivo desta pesquisa foi avaliar o uso de FTIR-ATR como uma técnica capaz de predizer o tempo de maturação e características de composição e qualidade do queijo artesanal do Serro.

2. Metodologia:

2.1 Aquisição e maturação dos queijos artesanais do Serro:

Os cinquenta queijos artesanais utilizados no estudo foram adquiridos na Cooperativa dos Produtores Rurais do Serro Ltda. (Cooperserro), Minas Gerais, compreendendo amostras produzidas com diferentes fermentos naturais (“pingo” e “rala”) e maturados em diferentes condições (embalado a vácuo em temperatura controlada a 8°C e não embalado e maturado a temperatura ambiente). As amostras foram analisadas com 3, 10, 17, 24, 31 dias de maturação para todas as condições.

2.2 Predição do tempo de maturação e características de qualidade do queijo minas artesanal do Serro por espectroscopia no infravermelho (FTIR-ATR)

As amostras de queijo artesanal nos diferentes tratamentos e tempos foram analisadas em triplicata. Para análise foi utilizado um espectrofotômetro Varian modelo 640 IR, realizadas em atmosfera seca à temperatura ambiente ($20 \pm 0,5$ °C). Para as medições da Reflectância Total Atenuada (ATR) foi utilizado um acessório de amostragem ATR (Pike technologies - modelo Gladi ATR), constituído de cristal de diamante monolítico. Os

espectros foram obtidos no intervalo de 4000-200 cm^{-1} com 4 cm^{-1} de resolução e 32 varreduras acumuladas para formar o espectro final. O software utilizado foi o Varian Resolutions Pro[®], o tratamento dos espectros consistiu em subtração de fundo e correção da linha de base.

Para a aquisição dos espectros, as amostras foram cortadas no centro geométrico do queijo e com o auxílio de uma espátula foi extraído pedaço em formato cúbico, de aproximadamente 1 cm, e estas foram transferidas diretamente para a superfície do cristal do ATR.

Primeiramente, para a obtenção do espectro de referência (*background*) não foi utilizada amostra na superfície do cristal do ATR, procedimento realizado com o objetivo de eliminar qualquer sinal de CO_2 na aquisição do espectro. Após a realização do *background*, frações das amostras foram dispostas sobre o cristal e submetidas à leitura.

2.3 Análise estatística e modelagem:

Os dados dos perfis espectrais obtidos da análise FTIR-ATR foram depurados selecionando os valores de transmitância no intervalo 3500-800 cm^{-1} por apresentarem inconsistência entre os perfis de algumas amostras. Após depuração, foram utilizadas 36 amostras para treinamento e 12 para a etapa de teste ou validação do modelo. Em seguida, os dados foram dispostos em uma matriz de dados, submetidos a um pré-processamento aplicando-se derivação pelo método de Savitzky-Golay (1^a, 2^a e 3^a derivadas, polinômio de ordem 2, janela de 15 pontos), auto escalonamento e correção multiplicativa de sinal. As análises foram realizadas utilizando o software Solo, versão 8.1 (Eigenvector Research, Inc.). Após o pré-processamento, a matriz de dados de calibração foi analisada pelo método de reconhecimento de padrões PLS-DA para definição do modelo de calibração. Em seguida, os modelos foram submetidos à etapa de validação interna, realizada por meio do método de *cross-validation*. Cada amostra do conjunto de treinamento foi removida aleatoriamente e avaliada individualmente. Durante esse procedimento, novos modelos foram sendo construídos e os erros de validação interna foram armazenados para obtenção do erro total (RMSECV). A detecção de pontos de *outlier* foi avaliada por meio da observação dos valores de alavancagem e resíduos Q a 95% de confiança. As variáveis avaliadas para escolha do modelo de predição foram o erro total após validação interna (RMSECV), sensibilidade, seletividade, coeficiente de determinação.

3. Resultados e Discussão:

Os queijos artesanais do Serro foram analisados por FTIR-ATR entre a faixa de comprimento de ondas de 4000 e 200 cm^{-1} . Na Figura 1, temos a média dos espectros obtidos em triplicata e estes correspondem as principais bandas de absorção.

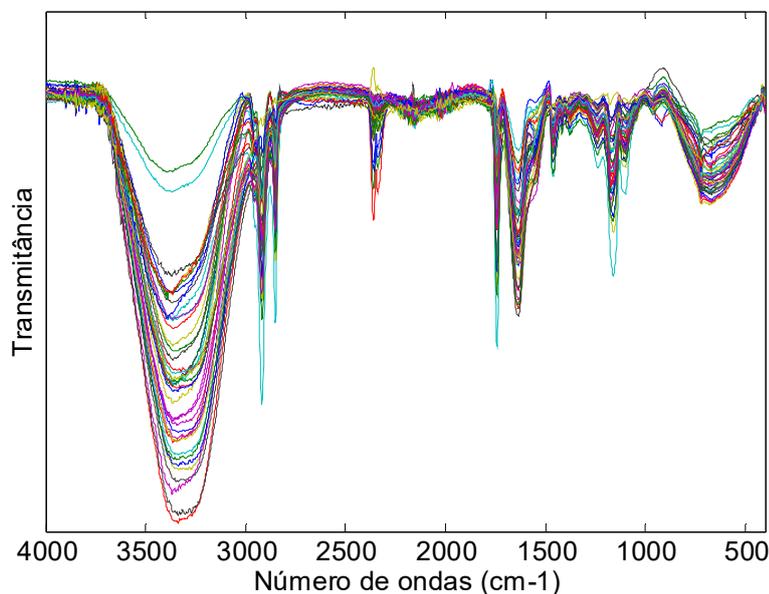
No geral, o perfil espectroscópico apresentado pelas amostras se mostrou similar entre as variáveis estudadas, assim é possível avaliar as faixas referentes a diferentes grupos químicos e as informações sobre a evolução da composição dos queijos durante o período de maturação é dada em cada região espectral que corresponde a um pico.

A região espectral de 2700 a 1800 cm^{-1} foi eliminada por não apresentar picos relevantes, da mesma forma como reportado por Martín-del-Campo *et al.* (2007), Lermagarcía *et al.* (2010) e Azarias (2017). Similarmente, a região nos comprimentos de onda 4000 a 1700 cm^{-1} não é muito explorada devido ao fato de que nesta faixa do espectro estão presentes, principalmente, compostos como água e gás carbônico (CARVALHO *et al.*, 2015).

Os picos de absorção entre 1700 cm^{-1} e 1500 cm^{-1} correspondem a Amida I (1640 cm^{-1}) e Amida II (1550 cm^{-1}), região relacionada à resposta a proteínas (MARTIN-del-CAMPO *et al.*, 2007). Observa-se (Figura 1) comportamento semelhante nos espectros obtidos ao longo da maturação do queijo. Houve diminuição na absorbância durante a maturação, tanto para as amostras produzidas com pingo e rala e em ambas as temperaturas de armazenamento, sendo esta diminuição mais acentuada nas amostras com maior período de maturação. Segundo Azarias (2017), este comportamento de diminuição da absorbância nas duas bandas de absorção características e originárias do grupamento amida (1640 cm^{-1} e 1550 cm^{-1}) caracteriza a ocorrência de proteólise.

A proteólise é o evento mais importante e também mais complexo dentre os três eventos primários que ocorrem na maturação. Nesta fase há mudanças na textura e funcionalidades do queijo com significativa contribuição para o sabor (McSWENEY, 2011). Na literatura é relatado a evolução das bandas amidas em diferentes variedades de queijo (GUERZONI *et al.*, 1999; MAZERROLLES *et al.*, 2001; VANINI *et al.*, 2001, AZARIAS, 2010).

Figura 1- Espectros de amostras de queijo minas artesanal do Serro produzidos com diferentes fermentos e maturados em condições distintas e por tempos distintos.



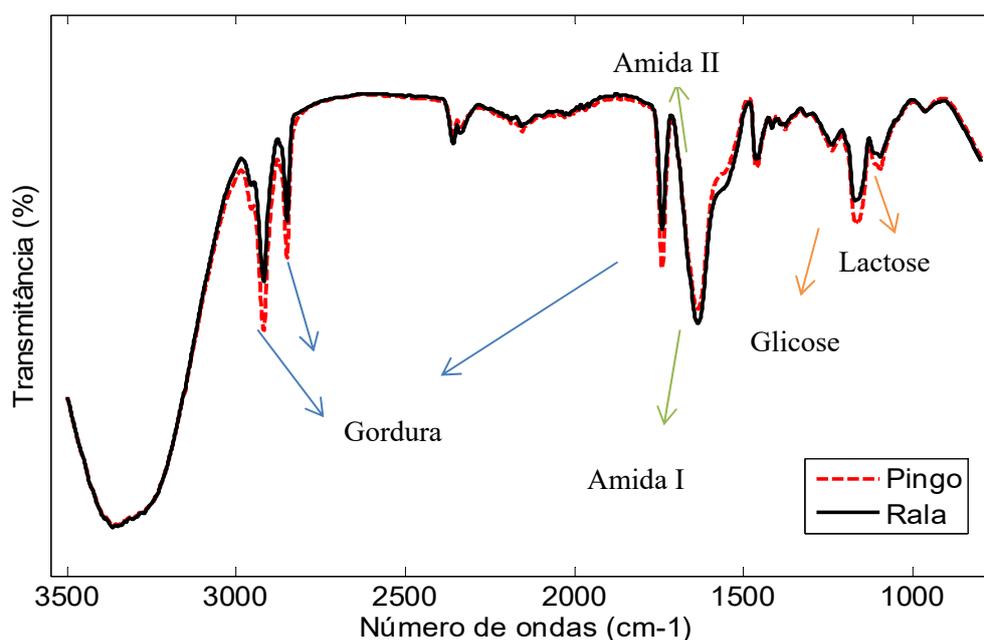
Assim como a proteólise, a lipólise representa uma importante fase de transformações na estrutura do queijo. A lipólise corresponde à hidrólise das gorduras através de lipases com formação de ácidos graxos de baixo peso molecular. Tais reações ocorrem por ação dos micro-organismos presentes e/ou através de enzimas adicionadas especificamente para esse fim. Os principais ácidos formados são butírico, capróico, caprílico, cáprico e láurico (PERRY, 2004).

As regiões que correspondem às bandas de absorção dos lipídios se referem aos comprimentos de ondas na faixa de 3000 a 2800 cm^{-1} e 1765 a 1730 cm^{-1} (RODRIGUEZ-SAONA *et al.*, 2006; CARVALHO *et al.*, 2015; AZARIAS, 2017). Pode-se perceber pela Figura 1 que os picos que correspondem a bandas de gorduras mostraram comportamento similar e apresentaram diminuição na absorbância ao longo do período de maturação. Resultados semelhantes foram encontrados por Azarias, (2017) em queijo Pecorino e Gouda e Martin-del-Campo *et al.*, (2007) em queijo Camembert.

A zona de absorção dos carboidratos e ácidos orgânicos são observados na região 1490 cm^{-1} a 950 cm^{-1} , os picos localizados ao redor de 1377 cm^{-1} são associados à glicose e galactose. E a banda 1096 cm^{-1} (álcool secundário), 1082 cm^{-1} e 1045 cm^{-1} (álcool primário) tem sido associados à lactose (MARTIN-DEL-CAMPO *et al.*, 2007).

A diferença no espectro dos queijos produzidos com pingo e rala são pequenas, conforme evidenciado na Figura 2. Essa pequena diferença espectral dificultou a validação interna (cross-validation) do modelo de classificação, resultando em um modelo com baixa sensibilidade e especificidade para identificar amostras em relação ao tipo de fermento utilizado.

Figura 2- Espectros no infravermelho (FTIR-ATR) de queijos minas artesanais do Serro produzidos com diferentes fermentos endógenos.



Pode-se observar (Figura 2) diferenças nos espectros relacionados a gorduras e carboidratos, principalmente nos picos relacionados à glicose, galactose e lactose nos queijos produzidos com pingo, apresentando diminuição na absorbância destes picos quando comparados aos queijos produzidos com rala.

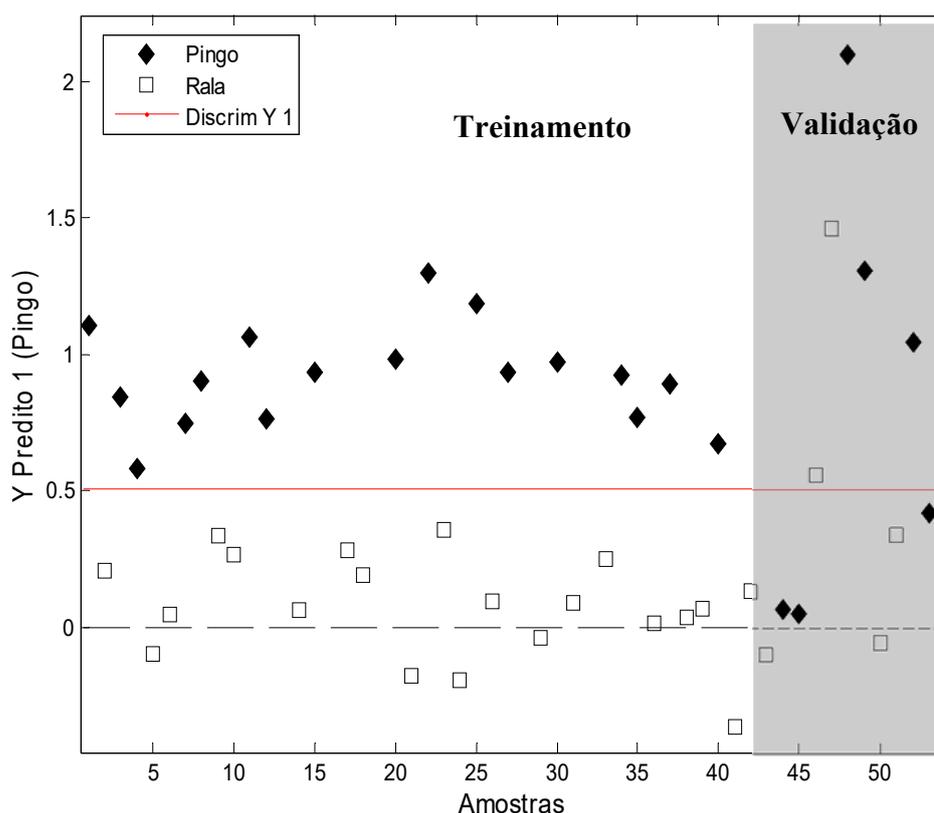
Em relação aos picos amida I e amida II, temos pequenas diferenças entre os espectros, dos queijos produzidos com rala e pingo. As modificações na intensidade e posição de diferentes bandas no pico amida I e II têm sido associadas à mudança na estrutura secundária da caseína, proteína agregação e interação proteína água, além da ocorrência de proteólise (MAZERROLLES *et al.*, 2001; VANINI *et al.*, 2001).

O modelo de melhor ajuste foi obtido aplicando como pré-processamento o autoescalonamento, seguido da suavização por Savitzky-Golay (3ª derivada, polinômio de ordem 3 e janela de 15 pontos) e as 3 variáveis latentes foram capazes de explicar 22,2% da variância de X e 84% da variância de Y.

Os resultados de classificação para as etapas de treinamento e teste são apresentados na Figura 3. Na fase de treinamento foram utilizadas 36 amostras de queijos, sendo 17 de pingo e 19 de rala. Já na fase de validação foram adquiridas 12 novas amostras, metade de cada tipo de fermento. O resultado da classificação das amostras da fase de validação está representado na área sombreada da Figura 3.

A Figura 3 mostra a classificação das amostras para o fermento pingo, onde as amostras classificadas como pingo são representadas na região acima da linha discriminante (Discrim Y1), que corresponde ao limite de corte (discriminativo) definido pelo modelo para cada tipo de fermento.

Figura 3 - Classificação das amostras na fase de treinamento e validação de amostras de queijo minas artesanal do Serro em relação ao tipo de fermento.



A estatística do modelo de classificação é apresentada na Tabela 1. Observa-se que o modelo apresentou máxima sensibilidade para a calibração e índice bem inferior (0,471) para classificação dos queijos produzidos com pingo na validação cruzada interna. Como reflexo, observa-se a classificação incorreta de três amostras de queijo fabricados com pingo, classificadas pelo modelo como sendo de rala.

Tabela 1. Parâmetros do modelo de classificação do queijo minas artesanal do Serro em relação ao tipo de fermento utilizado.

Parâmetro	Classe 1 (pingo)	Classe 2 (rala)
Sensibilidade (calibração)	1	1
Seletividade (calibração)	1	1
Sensibilidade (cross-validation)	0,471	0,737
Seletividade (cross-validation)	0,737	0,471
RMSEC	0,199	0,199
RMSECV	0,559	0,559
R ² (calibração)	0,84	0,84
R ² (cross-validation)	0,015	0,015

Na literatura temos informações sobre a viabilidade do uso da espectroscopia na obtenção características de qualidade de queijos. Soto-Bajaras *et al.* (2013) conseguiram com sucesso prever o tempo de maturação e o tipo de leite (vaca, cabra, ovelha) utilizado na produção de queijo. Karoui *et al.* (2006) encontraram correlação entre os atributos sensoriais do queijo Camembert e viabilidade da espectroscopia em prever estes atributos. Subramanian *et al.* (2011) através do uso de FTIR e modelos matemáticos de análise multivariada estabeleceram período de maturação e níveis de aminoácidos e ácidos orgânicos do queijo Cheddar. Loudiyi e Kaddour (2018) analisaram queijos com diferentes tipos de sais (NaCl e KCl) e tempos de maturação (5 e 10 dias) e como resultado conseguiram caracterizar com sucesso os queijos de acordo com o teor de sal e tempo de maturação.

Outra característica de qualidade de fundamental importância para o queijo artesanal do Serro é o tempo de maturação, parâmetro bem definido na legislação sanitária como critério de inocuidade do produto. A legislação estadual estabelece o período mínimo de 17 dias de maturação para a comercialização do queijo artesanal do Serro.

O modelo de melhor ajuste para classificação das amostras de queijo do Serro em relação ao tempo de maturação como menos de 17 dias foi obtido, aplicando, como pré-processamento a correção multiplicativa de sinal (MSC), suavização por Savitzky-Golay (2ª derivada, polinômio de ordem 3 e janela de 15 pontos) e o auto escalonamento. As quatro variáveis latentes selecionadas foram capazes de explicar 47,2% da variância de X e 96,9% da variância de Y.

Os resultados de classificação para as etapas de treinamento e teste são apresentados na Figura 4. Na fase de treinamento foram utilizadas 36 amostras de queijos, sendo 10 com

tempo de maturação maior ou igual à 17 dias. Dessas 10 amostras, metade eram amostras embaladas a vácuo e maturadas sob refrigeração (8°C) e as outras 5 amostras eram maturadas a temperatura ambiente não embaladas. A validação foi realizada com 12 amostras diferentes das 36 utilizadas na fase de treinamento, sendo que todas as 12 tinham menos de 17 dias de maturação, variando de 4 a 14 dias de maturação. Pelos resultados apresentados na Figura 4, conclui-se que o modelo conseguiu classificar de forma satisfatória o tempo de maturação das amostras de queijos em torno dos 17 dias.

A estatística do modelo de classificação em relação ao tempo de maturação é apresentada na tabela 2. Observa-se que o modelo prediz de maneira satisfatório o tempo de maturação, com sensibilidade e seletividade próximo de 1, assim como o coeficiente de determinação.

Apesar dos resultados satisfatórios para classificação das amostras de queijos artesanais em relação ao tempo de maturação, o modelo desenvolvido deve ser validado com uma maior quantidade de amostras.

Entre alguns estudos com predição do período de maturação em queijos, tem-se a pesquisa de Lerma-Garcia *et al.*, 2010, que utilizaram FTIR para classificar os queijos Pecorinos segundo diferentes estágios de maturação (duros e semi-duros) ou de acordo com técnica de fabricação (queijos de fossa e nonfossa). Uma excelente resolução foi alcançada, de acordo com tempo de maturação e técnica de fabricação. Currò *et al.*, 2017 avaliaram a viabilidade da espectroscopia no infravermelho próximo (NIR) para predizer o período de maturação de cinco variedades de queijo (Asiago, Grana Padano, Montasio, Parmigiano Reggiano, e Piave), os resultados demonstraram a viabilidade do NIR para predizer o tempo de maturação do queijo com grande precisão, usando *cross validation* e abordagens de validação externa. Martin-del-campo avaliou o potencial de FTIR na predição do período de maturação do queijo Camembert e constatou bons resultados na predição do tempo de maturação com erro de, aproximadamente, um dia.

Figura 4- Classificação das amostras na fase de treinamento e validação de queijo minas artesanal do Serro em relação ao tempo de maturação com menos de 17 dias.

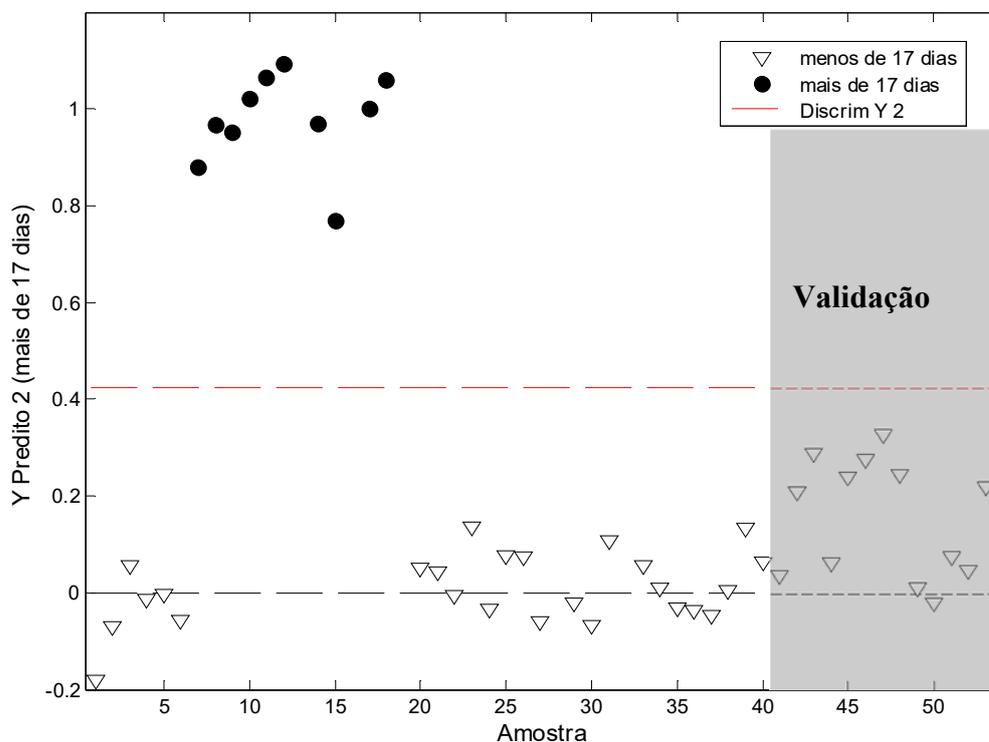


Tabela 2. Parâmetros do modelo de classificação do queijo minas artesanal do Serro em relação ao tempo de maturação maior ou menor que 17 dias.

Parâmetro	Classe 1 (pingo)	Classe 2 (rala)
Sensibilidade (calibração)	1	1
Seletividade (calibração)	1	1
Sensibilidade (cross-validation)	1	0,9
Seletividade (cross-validation)	0,9	1
RMSEC	0,078	0,078
RMSECV	0,211	0,211
R2 (calibração)	0,97	0,97
R2 (cross-validation)	0,78	0,78

4. Conclusão

A espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR-ATR), aliada aos métodos quimiométricos, mostrou-se capaz de prever, com sucesso, o tempo de maturação do queijo artesanal Serro, tendo como referência o parâmetro estabelecido pela legislação. Contudo, não foi possível, com os dados obtidos neste trabalho, obter um modelo com poder discriminatório satisfatório para classificar os queijos em relação ao tipo de fermento, pingo ou rala, utilizado na produção.

A metodologia proposta diferencia-se dos métodos tradicionais pela rapidez de análise, simplicidade de procedimentos e não necessitam de reagentes químicos, que são características desejáveis no controle de qualidade do queijo artesanal mineiros.

Referências:

- AZARIAS, C. A. **Utilização da espectroscopia de infravermelho para determinação rápida do índice de maturação em queijos Pecorino, maturado e Gouda fabricados com leite de ovelha**, 2017, 104p. Dissertação (Mestrado Profissional em Ciência e Tecnologia do Leite e Derivados)- Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora, Minas Gerais, 2017.
- BARBOSA, L. C. A. Espectroscopia no infravermelho na caracterização de compostos orgânicos. 1º ed. editora Viçosa, 2013.
- BLAZQUEZ, C. G. et al. Modelling of sensory and instrumental texture parameters in processed cheese by near infrared reflectance spectroscopy. **Journal of Dairy Research**, v.73, p. 58–69, 2006.
- BRUMADO, E. C. C. **Impacto do tipo de fermento endógeno na qualidade e tempo de maturação de queijo minas artesanal produzido em propriedades cadastradas pelo IMA (Instituto Mineiro de Agropecuária) na região do Serro-MG**, 2016, 158 p. Tese (Doutorado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Minas Gerais, 2016.
- CARDOSO, V. M. 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, n. 3, p. 743-749, 2013.
- CARDOSO V. M. *et al.* The influence of seasons and ripening time on yeast communities of a traditional Brazilian cheese. **Food Research International**, v.69, p. 331–340, 2015.
- CARVALHO, B. M. A. Rapid detection of whey in milk powder samples by spectrophotometric and multivariate calibration. **Food Chemistry**, v.174, p. 1-7, 2015.
- CHEN, G. et al. Application of infrared microspectroscopy and multivariate analysis for monitoring the effect of adjunct cultures during Swiss cheese ripening. **Journal of Dairy Science**, v. 92, n. 8, p. 3575–3584, 2009.
- CURRÒ, S. et al. Technical note: Feasibility of near infrared transmittance spectroscopy to predict cheese ripeness. **Journal of Dairy Science**, v. 100, n. 11, 2017.
- DOMINGOS, E. et al. Melamine detection in milk using vibrational spectroscopy and chemometrics analysis: A review. **Food Research International**, v. 60, p. 131–139, 2014.
- FIGUEIREDO, S. P.; BOARI, C. A.; SOBRINHO, P. de S. C.; CHAVES, A.C. S. D.; SILVA, R. B. CORREIO, H.B. F. S. Características do leite cru e do queijo minas artesanal em diferentes meses. **Archives of Veterinary Science**, v. 20, n. 1, p. 68-82, 2015.
- GORI, A. et al. Discrimination of grated cheeses by Fourier transform infrared spectroscopy coupled with chemometric techniques. **International Dairy Journal**, v. 23, p. 115e120, 2012.
- KAROUI, R., E. *et al.* Fluorescence and infrared spectroscopies: A tool for the determination of the geographic origin of Emmental cheeses manufactured during summer. **Lait**, v. 84, p. 359-365, 2004

- KAROUI, R., E. *et al.* The potential of combined infrared and fluorescence spectroscopies as a method of determination of the geographic origin of Emmental cheeses. **International Dairy Journal**, v. 15, p. 287–298, 2005.
- KOCAOGLU-VURMA, N. A. *et al.* Rapid Profiling of Swiss Cheese by Attenuated Total Reflectance (ATR) Infrared Spectroscopy and Descriptive Sensory Analysis. **Journal of Food Science**, v. 74, n. 6, p. 232-239, 2009.
- KRAGGERUD, H.; NAES, T.; ABRAHAMSEN, R. K.; Prediction of sensory quality of cheese during ripening from chemical and spectroscopy measurements. **International Dairy Journal**, v. 34, p.6-18, 2014.
- LERMA-GARCÍA, J. M. *et al.* Classification of pecorino cheeses produced in Italy according to their ripening time and manufacturing technique using Fourier transform infrared spectroscopy. **American Dairy Science Association**, 2010.
- MARINHO, M. T. *et al.* Antioxidant effect of dehydrated rosemary leaves in ripened semi-hard cheese: A study using coupled TG–DSC–FTIR (EGA). **LWT - Food Science and Technology**, v. 63, n. 2, p. 1023–1028, 2015.
- MCSWEENEY, P. L. H. Biochemistry of Cheese Ripening, **Elsevier**. P. 667-674, 2011
- MARTÍN-DEL-CAMPO, S.T. *et al.* Middle infrared spectroscopy characterization of ripening stages of Camembert-type cheeses. **International Dairy Journal**, v.17, p. 35–845, 2007.
- MARTINS, J. M. *et al.* Determining the minimum ripening time of artisanal Minas cheese, a traditional Brazilian cheese. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 46, n. 1, p. 219-230, 2015.
- MAZEROLLES, G. *et al.* Infrared and fluorescence spectroscopy for monitoring protein structure and interaction changes during cheese ripening. **Le Lait**, 81, 509–527, 2001.
- MOATSOU, G., T. *et al.* Evolution of proteolysis during the ripening of traditional Feta cheese. **Lait**, v. 82, p. 601–611, 2002.
- PANARI, G., P. *et al.* Variazione della composizione e andamento della proteolisi del Parmigiano-Reggiano nel corso della maturazione in riferimento al profilo (centro e periferia) della forma. **Scienza e Tecnica Lattiero-Casearia**, v. 54, n. 199–212, 2003.
- PERIN, L. M. *et al.* Bacterial ecology of artisanal Minas cheeses assessed by culture dependent and –independent methods. **Food Microbiology**, v. 65, p. 160–169, 2017.
- PERRY, K.S. P. Queijos: aspectos químicos, bioquímicos e microbiológicos. **Química Nova**, v. 27, n. 2, p. 293-300, 2004.
- PINTO, M. S. *et al.* Survival of *Listeria innocua* in Minas Traditional Serro cheese during ripening. **Food Control**, v. 20, p. 1167–1170, 2009.
- PINTO, M. S. *et al.* The effects of Nisin on *Staphylococcus aureus* count and the physicochemical properties of Traditional Minas Serro cheese. **International Dairy Journal**, v.21, p. 90–96, 2011.

POVEDA, J. M., e CABEZAS, L. Free fatty acid composition of regionally produced Spanish goat cheese and relationship with sensory characteristics. **Food Chemistry**, v. 95, p. 307-311, 2006.

RODRIGUEZ-SOANA, L. E. *et al.* Rapid determination of Swiss cheese composition by Fourier transform infrared/attenuated total reflectance spectroscopy. **Journal of Dairy Science**, 89, 1407–1412, 2006.

SHIOTA, M. *et al.* Effects of Flavor and Texture on the Sensory Perception of Gouda-Type Cheese Varieties during Ripening Using Multivariate Analysis. **Journal of Food Science**. v. 80, n.12, p. 2740-2750, 2015.

SOTO-BARAJAS, M. C. *et al.* Prediction of the type of milk and degree of ripening in cheeses by means of artificial neural networks with data concerning fatty acids and near infrared spectroscopy. **Talanta**, v. 116, p. 50–55, 2013.

SUBRAMANIAN, A. Monitoring amino acids, organic acids, and ripening changes in Cheddar using Fourier-transform infrared spectroscopy. **International Dairy Journal**, v. 21, p. 434-440, 2011.

VANNINI, L., *et al.* Use of Fourier transform infrared spectroscopy to evaluate the proteolytic activity of *Yarrowia lipolytica* and its contribution to cheese ripening. **International Journal of Food Microbiology**, 69, 113–123, 2001.

ZIELINSKI, A. A. F.; HAMINIUK, C. W. I.; NUNES, C. A.; SCHNITZLER, E.; VAN RUTH, S. M.; GRANATO, D. Chemical Composition, Sensory Properties, Provenance, and Bioactivity of Fruit Juices as Assessed by Chemometrics: A Critical Review and Guideline. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 13, n. 3, p. 300–316, 2014.

Considerações finais:

O período e condições de maturação se mostraram determinantes na sobrevivência inativação da *Listeria monocytogenes*. Por outro lado não foi determinante na redução das contagens de *S. aureus* coagulase positivo. Sendo assim é fundamental o desenvolvimento de mais estudos que englobem queijos outros produtores de queijo do Serro para conhecer o comportamento destes micro-organismos patogênicos a fim de se estabelecer tempos de maturação do queijo minas artesanal que garantam segurança no consumo deste produto.

É necessário também o desenvolvimento de mais pesquisas relacionadas ao queijo do Serro, especialmente na área de análise sensorial, a fim de se obter maiores informações acerca de fatores que influenciam na sua aceitação, uma vez que o estudo foi desenvolvido em um grupo específico de pessoas, evidencia-se a necessidade de estudos de análise sensorial descritiva, na busca de melhoria na comercialização e fatores determinantes da qualidade do produto.

Em relação à espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR-ATR), a técnica mostrou-se capaz de inferir com precisão características de qualidade de um queijo artesanal brasileiro. Contudo, é importante a busca de mais conhecimento na caracterização de outros aspectos de qualidade, pois trata-se de uma ferramenta com enorme potencial na obtenção de informações sobre a composição química dos alimentos de forma rápida, precisa, com mínimo de reagentes químicos.