



DANILO JOSÉ MACHADO DE ABREU

**QUEIJO MINAS ARTESANAL DA CANASTRA: INOCUIDADE
E TRANSFORMAÇÕES DURANTE A MATURAÇÃO**

**LAVRAS - MG
2023**

DANILO JOSÉ MACHADO DE ABREU

**QUEIJO MINAS ARTESANAL DA CANASTRA: INOCUIDADE E
TRANSFORMAÇÕES DURANTE A MATURAÇÃO**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras,
como parte das exigências do Programa de Pós-
Graduação em Microbiologia agrícola, área de
concentração em qualidade e segurança
microbiológica de alimentos para a obtenção do título
de Doutor.

Prof. Dr^a. Roberta Hilsdorf Piccoli
Orientadora

**LAVRAS- MG
2023**

**Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de Geração de Ficha Catalográfica da Biblioteca
Universitária da UFLA, com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).**

Abreu, Danilo José Machado de.

Queijo Minas Artesanal da Canastra: inocuidade e
transformações durante a maturação / Danilo José Machado de
Abreu. - 2023.
120 p. : il.

Orientador(a): Roberta Hilsdorf Piccoli.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Lavras, 2023.
Bibliografia.

1. Qualidade de queijos. 2. Patógenos de origem alimentar. 3.
Dinâmica microbiana. I. Piccoli, Roberta Hilsdorf. II. Título.

DANILO JOSÉ MACHADO DE ABREU

**QUEIJO MINAS ARTESANAL DA CANASTRA: INOCUIDADE E
TRANSFORMAÇÕES DURANTE A MATURAÇÃO**

**MINAS ARTISANAL CHEESE FROM CANASTRA: SAFETY AND
TRANSFORMATIONS DURING MATURATION**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras,
como parte das exigências do Programa de Pós-
Graduação em Microbiologia agrícola, área de
concentração em qualidade e segurança
microbiológica de alimentos para a obtenção do título
de Doutor.

APROVADA em 06 de junho de 2023.

Dr^a. Alcilene de Abreu Pereira – IFMG

Dr^a. Cristina Ferreira Silva e Batista – UFLA

Dr^a. Jaqueline de Paula Rezende - UFLA

Dr. Cleube Andrade Boari – UFVJM

Prof. Dr^a. Roberta Hilsdorf Piccoli
Orientadora

**LAVRAS- MG
2023**

Dedico...

*Ao meu gato Augusto que tanto fez por mim
desde que chegou em minha vida.*

AGRADECIMENTOS

À Deus, por me dar a vida e a oportunidade de viver como eu realmente sou.

À Capes por conceder a bolsa, que permitiu a execução deste trabalho.

Ao CNPq que permitiu o financiamento da pesquisa.

À FAPEMIG pelo financiamento da pesquisa.

Ao IMA que incentivou e financiou o estudo.

À Universidade Federal de Lavras (UFLA), por todo apoio técnico e estrutural.

À esta pessoa que vós falais, pela minha resiliência, paciência e perseverança.

A minha orientadora Prof. Dr^a Roberta Hilsdorf Piccoli pela honra e oportunidade de trabalhar juntos e por acreditar e confiar no trabalho realizado, sempre com muita paciência e transmitindo todo seu conhecimento.

As professoras Dr^a Elisângela Elena Nunes Carvalho e Dr^a Rosane Freitas Schwan que me ajudaram no desenvolvimento técnico e intelectual, além de me fazerem acreditar em todo meu potencial.

Aos Professores que durante toda a pós-graduação me fizeram crescer com lições e conhecimento.

Aos produtores de queijo minas artesanal da região da Canastra pelo fornecimento da matéria prima deste estudo.

Às pós-doutorandas Dr^a Silvia Juliana Martinez e Dr^a Nadia Nara Batista, pelo apoio técnico.

Agradeço a toda a minha Família que sempre esteve ao meu lado e que me ajudou a crescer de forma amável. Ao meu Pai, Sebastião de Abreu, por todos os exemplos de vida ensinados. A minha mãe Margareth Machado, pelo amor e superação, por ter tido paciência e ter entendido que minha ausência foi por um bem maior. Ao meu irmão e amigo, Felipe Machado, que sempre esteve do meu lado e sempre se preocupou comigo. A mais nova integrante da família, Patrícia Meurer, por sempre me colocar para cima, com seu astral incrível, e aos meus sobrinhos José Pedro e a ainda não nascida, Laura, que amo tanto. E a toda família Abreu.

À minha família Lavrense, Elisângela Elena Nunes Carvalho e Adeilson Carvalho, e seus filhos Diogo, Elisa e Beatriz, que me acolheram e me deram suporte emocional.

Ao meu companheiro, Mário Sergio Lorenço, que sempre esteve ao meu lado, me amando e ajudando, mesmo eu pedido para fazer as coisas duas vezes, e sua família, por terem me recebido com amor e compreensão nesse difícil período de desenvolvimento científico.

Aos meus amigos mais próximos e que me ajudaram nessa caminhada e que me fizeram sorrir todas as vezes que eu me sentia pra baixo. A Juliana, por sempre me dar conselhos e me fazer indagar os acontecimentos da vida, ao Bruno, por ser um porto seguro e me fazer observar que no final as coisas sempre vão dar certo.

As amigas do mestrado Bruna Melo, Raquel Troncoso, que tiveram um papel importante na formação do meu caráter ético e profissional, além de me levarem sempre para beber cerveja todas as vezes que estava na sagrada Goiânia.

Aos amigos do laboratório de microbiologia de alimentos do departamento de alimentos da universidade Federal de Lavras. Em especial a Fernanda Pereira, que sempre esteve disposta a trabalhar de noite, madrugada, no frio e nos finais de semana para a conclusão deste trabalho.

Às técnicas mais amadas do Departamento de ciências dos alimentos, Pamela Mattioli de Oliveira e Creuza Pedroso do Amaral Rezende, por sempre oferecerem uma conversa, um café e um acalento na alma.

À comissão organizadora do SIMA, por ser uma das comissões mais animadas, engajadas e risonhas do mundo. Em especial a turma do fundão (Vocês sabem de quem eu estou falando).

Agradeço à todos que por meio de alguma ação contribuíram para minha formação.

“O lugar para onde o caminho nos levará depende da nossa própria vontade e de nossos pensamentos”. (Marion Zimmer Bradley)

RESUMO

O Queijo Minas Artesanal (QMA) é um produto característico do estado de Minas Gerais, Brasil. É produzido com leite cru bovino e adição de uma cultura starter endógena chamada “pingo”, responsável pela inoculação de microrganismos específicos que realçam o sabor, aroma e outros aspectos sensoriais desejáveis para o produto. A alta importância econômica e cultural do queijo artesanal no Brasil justifica os esforços para garantir sua segurança, qualidade e procedência. Deste modo, o presente trabalho teve como objetivo: i) Avaliar a relação dos parâmetros físico-químicos e dinâmica microbiana durante a maturação de QMA produzidos em diferentes fazendas, por metodologias moleculares, físico-químicas e multivariadas. ii) Estudar o processo de inocuidade de QMA pela inoculação de patógenos de origem alimentar durante o processo de maturação de trinta dias, utilizando ferramentas químicas, moleculares e análises estatísticas multivariadas. Para isso QMA da região da canastra (QMA-MC), recém-fabricados foram coletados em propriedades localizadas em Bambuí e Tapiraí. Realizou-se um estudo da dinâmica microbiana por meio de metodologias dependentes de cultura, pelo uso de meios seletivos diferenciais, e métodos independentes de cultura, o PCR-DGGE. Além disso, foram isoladamente inoculadas *Staphylococcus aureus* ATCC13565 e *Listeria monocytogenes* ATCC 19117, qual utilizou-se metodologia de qPCR, para acompanhar a expressão genica do gene sea e hlyA, respectivamente. Para avaliar a fisiologia da maturação, foram empregadas técnicas de cromatografia líquida (CLAE) para ácidos orgânicos e carboidratos, gasosa (GC), para os compostos voláteis, e espectroscopia infravermelho com transformada de Fourier (FTIR). O uso de redes neurais artificiais (RNA) e mapas auto-organizáveis (MAO) foram utilizados para compreender o processo de maturação, bem como avaliar a relação dos parâmetros. No primeiro tópico avaliado neste trabalho, os queijos produzidos em diferentes queijarias, apresentaram-se diferentes quanto ao consórcio microbiano, influenciando diretamente no processo de maturação. De maneira geral, as bactérias do ácido láctico (BAL) estavam ligados a produção de compostos básicos, como ácidos orgânicos, e os aeróbios mesófilos, leveduras e fungos filamentosos (quando presentes), estavam ligados a produção de compostos voláteis e a processos como proteólise, principalmente. Em relação ao segundo objetivo, foi observada redução da população de microrganismos patogênicos inoculados ao longo do tempo de maturação foi observada, principalmente pela ação de BAL e fungos filamentosos. Apesar disso, a qualidade microbiológica desses queijos ao fim da maturação demonstrou que trinta dias não foi suficiente para eliminar esse microrganismos patogênicos dos produtos, apenas diminuiu o risco de consumo do produto. Dessa maneira, vê-se a necessidade de correlacionar as boas práticas de fabricação a cadeia produtiva do queijo minas artesanal para garantir a qualidade do queijo curado.

Palavras-chave: Bactérias do ácido láctico. Bactérias patogênicas. Segurança de alimentos. Dinâmica microbiana. Compostos voláteis. Ácidos orgânicos. Textura. Proteólise. Parâmetros colorimétricos.

ABSTRACT

The Minas Artisanal Cheese (MAC) is a characteristic product of the state of Minas Gerais, Brazil. It is produced with raw cow's milk and the addition of an endogenous starter culture called "pingo", responsible for the inoculation of specific microorganisms that can enhance the taste and sensory aspects. The high economic and cultural importance of artisan cheese in Brazil justifies the efforts to guarantee its safety, quality and origin. Thus, the present work aimed to: i) Evaluate the physical-chemical relationship and microbial dynamics during ripening of artisanal minas cheese produced in different farms, by molecular, physical-chemical and multivariate methodologies. ii) Study the process of artisanal minas cheese safety by inoculation of foodborne pathogens during the thirty-day ripening process, using chemical, molecular tools and multivariate statistical analysis. For this purpose, freshly made artisan Minas cheeses from the Canastra microregion (MAC-CM) were collected from farms located in Bambuí and Tapiraí. A study of microbial dynamics was performed by culture dependent methodologies, by the use of differential selective media, and culture independent methods, the PCR-DGGE. Furthermore, *Staphylococcus aureus* ATCC13565 and *Listeria monocytogenes* ATCC 19117 were isolated and qPCR methodology was used to follow the *sea* and *hlyA* gene expression, respectively. To evaluate the physiology of maturation, liquid chromatography (HPLC) techniques were employed for organic acids and carbohydrates, gas chromatography (GC), for volatile compounds, and Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR). The use of artificial neural networks (ANN) and self-organizing maps (SOM) were used to understand the ripening process, as well as to evaluate the relationship of the parameters. In the first topic evaluated in this work, the cheeses produced in different cheese farms, presented different regarding the microbial consortium, directly influencing the ripening process. In general, the lactic acid bacteria (LAB) were linked to the production of basic compounds, such as organic acids, and the mesophilic aerobes, yeasts and filamentous fungi (when present), were connected with the production of volatile compounds and to processes such as proteolysis, mainly. Regarding the second objective, the reduction of the population of pathogenic microorganisms inoculated along the maturation time was observed, mainly by the action of BAL and filamentous fungi. Nevertheless, the quality of these cheeses at the end of ripening demonstrated that thirty days is not enough to eliminate these microorganisms from the products, only to decrease the risk of contamination of the consumer. Thus, there is a need to correlate the good manufacturing practices to the production chain of Minas artisanal cheese to ensure the quality of the ripened cheese.

Keywords: Lactic acid bacteria. Pathogenic bacteria. Food safety. Microbial dynamics. Volatile compounds. Organic acids. Texture. Proteolysis. Colorimetric parameter

SUMÁRIO

	PRIMEIRA PARTE	13
1	INTRODUÇÃO	13
2	REFERENCIAL TEÓRICO	14
2.1	Cadeia produtiva do leite	14
2.2	Queijo minas artesanal: histórico, produção e características	16
2.2.1	Histórico	16
2.2.2	Produção, consumo e perspectiva	17
2.2.3	Características gerais: perfil microbiológico, físico-químico e sensorial	18
2.3	Aspectos legais da produção de Queijo Minas Artesanal	20
2.4	Queijo minas artesanal da região da Canastra	25
2.5	Processo de produção do queijo minas artesanal	26
2.6	Maturação do queijo minas artesanal	27
2.7	Patógenos de origem alimentar e Doenças transmitidas por água e alimento (DTHA) em queijos	28
2.8	Qualidade e padrões microbiológicos	31
3	CONSIDERAÇÕES GERAIS	32
	REFERÊNCIAS	32
	SEGUNDA PARTE	41
	ARTIGO I - DIGITAIS MICROBIANAS BASEADAS EM PCR-DGGE PARA AVALIAÇÃO DA DINÂMICA MICROBIANA DA MATURAÇÃO DE QUEIJO MINAS ARTESANAL DA MICRORREGIÃO DA CANASTRA PRODUZIDOS DIFERENTES QUEIJARIAS	41
1	INTRODUÇÃO	43
2	MATERIAL E MÉTODOS	44
3	RESULTADO	50
4	DISCUSSÃO	66
5	CONCLUSÃO	69
	REFERÊNCIAS	69
	APÊNDICE I - Material suplementar	77
	ARTIGO II - DINÂMICA DE POPULAÇÃO E SOBREVIVÊNCIA DE <i>Listeria monocytogenes</i> E <i>Staphylococcus aureus</i> DURANTE A MATURAÇÃO DE QUEIJOS MINAS ARTESANAIS DA REGIÃO DA CANASTRA	82
1	INTRODUÇÃO	84
2	MATERIAL E MÉTODOS	85
3	RESULTADOS	91

4	DISCUSSÃO	103
5	CONCLUSÃO.....	105
	REFERÊNCIAS	105
	APÊNDICE II - Material complementar	112

PRIMEIRA PARTE

1 INTRODUÇÃO

O Brasil é um dos maiores produtores de leite do mundo, sendo que no ano de 2021, produziu cerca de 532,3 milhões de toneladas, com perspectiva de aumento dessa produção. Associado a essa tendência, grande parte dessa produção culmina na produção de derivados, principalmente na produção de queijos, tal qual foram produzidos cerca de 1,15 milhão de toneladas sob fiscalização (EMBRAPA, 2021; SORIO, 2018).

Minas gerais tem a maior bacia leiteira do país, além de ser tradicionalmente o maior produtor de queijos no Brasil, produzidos por aproximadamente 27 mil produtores, moradores de 519 do 823 municípios do estado (EMATER, 2023; EMBRAPA, 2018). O incentivo aos produtores vem sendo cada vez maior, principalmente, porque o investimento na regulamentação da produção e comercialização está sendo aplicada, no intuito de desenvolver os valores econômicos, culturais e sociais. As regiões reconhecidas como produtoras de queijo minas artesanais, somam mais de 35 mil toneladas de produtos fabricados anualmente, incluído as regiões Araxá, Serra de canastra, Cerrado, Serro, Serra do salitre, Triângulo mineiro, Serra da ibitipoca, Campos das vertentes, diamantina e Entre Serras da Piedade ao Caraça, onde foram reconhecidas pelo Instituto Mineiro de Agropecuária (IMA) (EMBRAPA, 2019; IMA, 2020).

A região da Serra da Canastra é a mais antiga e tradicional, produtora de queijos minas artesanais, por serem uma das primeiras regiões reconhecida pelo IMA, em 2004, pela portaria nº 694 (IMA, 2004). As condições físico-ambientais encontradas na região são favoráveis à produção de queijo, devido a um ambiente propício ao desenvolvimento de bactérias típicas que dão o sabor característico do queijo da Canastra (INPI, 2018) . O queijo dessa região é descrito como agradável de sabor ácido, com textura homogênea, que varia de semiduro a macio e de cor creme-claro (EMATER, 2023).

A produção de queijos minas artesanais (QMA) envolve modos tradicionais/artesanais, o qual se utiliza leite de vaca não pasteurizado para a produção, bem como uma cultura iniciadora, denominada” pingo”, que possui um consórcio microbiano que auxilia na construção do sabor, aroma e textura do queijo, denominado *terroir*. Cada região possui *terroir* individuais, principalmente, pela presença da diversificada microbiota, e o seu entendimento pode contribuir para entender a o estabelecimento de indicações geográficas como a denominação de origem protegida (DOP).

Diversos estudos avaliaram a presença da microbiota responsáveis pelas características individuais de cada região, mas também foram identificadas a presença de microrganismo patogênicos de origem alimentar, associado a cadeia produtiva e matéria prima utilizada, bem como a deficiência no uso de boas práticas de fabricação. A presença de patógenos desencadeou preocupações quanto a qualidade do queijo. Assim passou-se a utilizar processo de maturação para garantir a qualidade do produto, definidos através de estudos em conjunto com órgão governamentais. Apesar disso, estudos demonstraram que 14 dias definidos pela legislação podem não ser suficientes para garantir esse processo de qualidade.

Dessa maneira, o objetivo do presente estudos foram: i) Avaliar a relação entre parâmetros físico-químicos e a dinâmica microbiana durante a maturação de queijos minas artesanais produzidos em diferentes fazendas, por metodologias moleculares, físico-químicas e multivariadas; ii) Estudar o processo de inocuidade de queijos minas artesanais pela inoculação de patógenos de origem alimentar durante o processo de maturação de trinta dias, utilizando ferramentas químicas, moleculares e análises estatísticas multivariadas.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

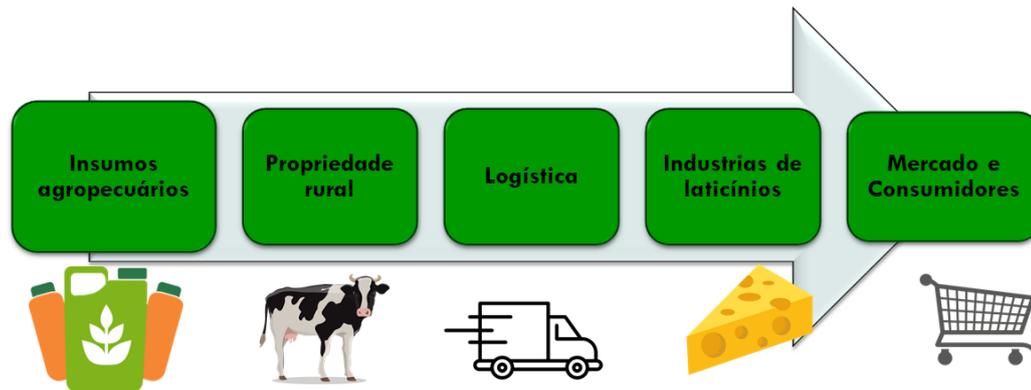
2.1 Cadeia produtiva do leite

O agronegócio tem se apresentado como uma das maiores atividades geradoras de riqueza frente a globalização econômica, de forma que os mercados vêm se integrando, possibilitando avanços tecnológicos e estruturais, elevando a produtividade (BOJNEC e FERTÓ, 2014; DELUIZ, 2004). Dentro do setor pecuário, a cadeia produtiva do leite bovino no mundo registrou em 2020 uma produção de 532,3 milhões de toneladas, com perspectiva de aumento e valorização de 2% para o próximo ano de 2022 (EMBRAPA, 2021).

A pecuária leiteira no Brasil, surgiu por volta de 1532, e a princípio permaneceu insignificante até meados dos anos de 1870, onde houve uma mudança no cenário político brasileiro. A mudança política proporcionou os primeiros passos para o início da modernização da pecuária no Brasil, quando se aprovou o regulamento de inspeção industrial e sanitária de produtos de origem animal (RISPOA), bem como a obrigatoriedade da pasteurização, a inspeção e o carimbo de Serviço de inspeção federal (SIF), além da classificação dos tipos de leite. A partir de 1990, estudos apontaram o crescimento da oferta de leite resultando no expressivo crescimento do rebanho, bem como da população (VILELA e colab., 2017).

A cadeia produtiva de leite no Brasil está distribuída em todo o território, no entanto, concentra-se, principalmente, na região sul e sudeste. Apesar de não existir um sistema de produção padronizado, didaticamente, a produção do leite pode ser dividida em cinco etapas: a primeira etapa, trata-se dos insumos agropecuários, necessários para aumentar a produtividade, bem como a melhora da produção e o bem-estar animal, como exemplo, podemos citar rações, sementes, adubos, vacinas e ferramentas moleculares, que estão cada vez mais sendo utilizadas. A propriedade rural, local onde o leite é produzido, envolve pequenos produtores e cooperativas, sendo responsáveis por 58% da oferta total. A terceira etapa, a logística, envolve empresas privadas transacionais, de forma que elas investem o seu capital externo, principalmente, na captação da matéria prima, bem como em sua distribuição até a beneficiadora. A quarta etapa, engloba as indústrias beneficiadoras da matéria prima, as quais processarão o leite em produtos lácteos, e por fim, a quinta etapa, ocorre quando há comercialização do produto principal e seus derivados (Figura 1) (Nardy, Rocha, da e Carvalho, 2019; Spers, Wright e Amedomar, 2013; TELLES et al., 2020).

Figura 1 - Cadeia produtiva do leite no Brasil.



Fonte: Do autor (2023).

Tendo em vista o desenvolvimento da cadeia produtiva do leite e a sua evolução, o Brasil, tornou-se o quarto maior produtor de leite no mundo, com uma produção de 33,5 bilhões de litros de leite. Apesar das restrições e medidas de prevenção devido a pandemia do novo coronavírus, o leite produzido sob inspeção no país, em 2020, cresceu cerca de 2,1%, quando comparado ao ano de 2019. Acredita-se que foi o melhor resultado da última década, revelando que o setor lácteo formal passou ao largo da crise gerada pela pandemia. Estados da região sul, centro oeste e sudeste contribuíram com o aumento da produção do leite no ano de 2020, de forma que minas gerais, tornou-se o estado com a maior participação no cenário nacional, cerca

de 27%. Além disso, o Brasil ainda contribui para exportação de produtos derivados do leite, como o leite condensado, creme de leite e queijo (Embrapa. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, 2019, 2021; Grace, Wu e Havelaar, 2020).

2.2 Queijo minas artesanal: histórico, produção e características

2.2.1 Histórico

A produção de queijo no Brasil possui um histórico controverso, principalmente, quanto a aspectos regionais e o período que essa prática foi iniciada. Acredita-se que a produção de queijo no Brasil, iniciou-se, provavelmente, com a colonização das terras brasileiras pelos portugueses. Por volta de 1534, registrou-se os primeiros rebanhos de gado, trazidos das Ilhas da Madeira e das Canárias por meio de Martim Afonso de Souza, (MENESES, 2006; RIBEIRO, 1959; ROGICK, 1960).

A descoberta de ouro e pedras preciosas em Minas gerais, na metade do século XVIII, muitos garimpeiros e aventureiros, deslocaram-se para terras mineiras, de forma que o gado veio a ser utilizado como a função de tração e transporte. Apesar desse gado, não ser designado para a produção de leite, parte da matéria prima, era destinada a produção de queijos semelhantes ao tradicional queijo português da Serra da Estrela. Esse queijo era elaborado com leite cru de ovelhas, e possuía características específicas de temperatura da região, com inverno rigoroso, pastagens de montanha, usando como elemento coagulador do leite, extrato de flor e brotos do cardo silvestre (*Cynara cardunculus* L). De forma a região serrana em Portugal apresenta peculiaridades que conferem ao produto e a seu modo de fazer características sensoriais e culturais que, também, concedem identidade à sociedade local (MENESES, 2006; NETTO, 2011; RIBEIRO, 1959).

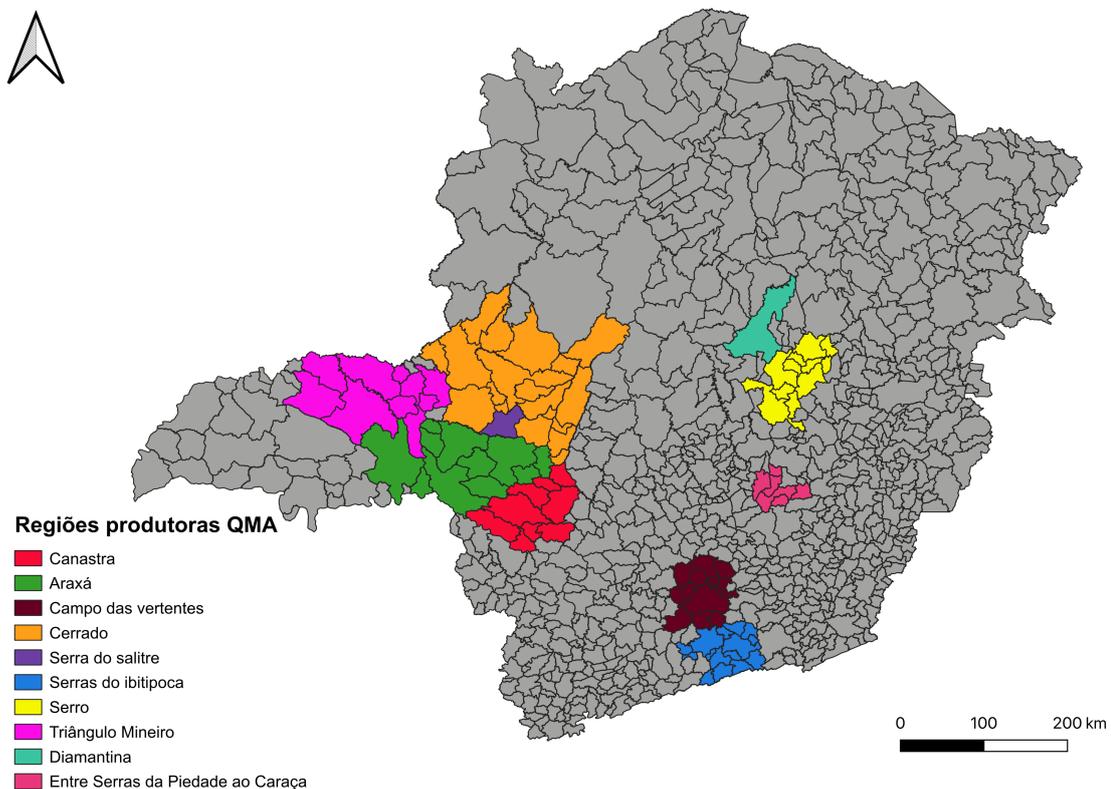
A produção de queijo artesanal no Brasil colonial diferencia-se do método Português pelo uso de leite de vaca, além do elemento coagulante, sendo utilizado estômago seco e salgado de mocó, bezerros ou cabritos, de forma que o fermento, responsável pelas características específicas ao queijo, chamado de “pingo”, é composto por um grupo de bactérias lactofermentativas típicas de cada região, considerado um acervo bacteriano. Este é responsável pelo padrão de cada região onde é produzido e reflete suas especificidades. O pingo é obtido juntamente com o soro que é drenado dos queijos recém produzidos durante a tarde e a noite

do primeiro dia de maturação (BORELLI, Beatriz Martins e colab., 2016; KAMIMURA, Bruna A. e colab., 2019).

2.2.2 Produção, consumo e perspectiva

O queijo minas artesanal é produzido e comercializado em diversas áreas de Minas Gerais, desde o século XVIII. A produção nas fazendas mineiras é altamente relevante para a composição da renda dos produtores familiares, assim como a manutenção de suas propriedades. Minas Gerais possui 853 municípios, dos quais 500 apresentam registro de produção de queijos minas artesanais, sendo os mesmos legais ou informais (MENESES, 2006). O instituto mineiro de agropecuária (IMA) reconhece dez regiões oficiais produtoras do tradicional queijo minas artesanal, sendo as microrregiões de Araxá, Serra de Canastra, Cerrado, Serro, Serra do salitre, Triângulo mineiro, Serra da Ibitipoca, Campos das Vertentes, Entre serras de Piedade ao Caraca e Diamantina (EMATER, 2004, 2021; EMBRAPA, 2020; IMA., 2020a; b), como observado na Figura 2.

Figura 2 - Microrregiões mineiras caracterizadas como produtoras de queijo minas artesanal.



Fonte: Do autor (2023).

O mercado lácteo no Brasil vem crescendo a cada ano de forma que queijo, independente de seu tipo, é o produto lácteo derivado que mais elevou o seu valor de venda ao longo dos anos, tornando o Brasil, o quinto produtor de queijos no mundo, ficando atrás apenas dos Estados Unidos, Alemanha, França e Itália. Dessa forma, teve uma participação de 24,84% na venda de produtos lácteos no ano de 2016. Em adição a isso, a produção desse derivado, foi impulsionada no ano de 2020, ao absorver 8.746 bilhões de litros para a sua produção, sendo uma fatia 2,8% maior que o ano anterior, levando em consideração um ano atípico (EMBRAPA., 2019).

Em Minas gerais, o queijo minas artesanal é um derivado que acompanha o crescimento dos outros tipos de queijo. Apesar de sua produção tímida, devido a mão de obra familiar, a produção por dia, na Serra da canastra, por exemplo, é de dia 16500 kg. A produção anual, incluindo as cinco regiões é de 50 mil toneladas ao ano. Esse aumento deve-se a alguns aspectos, o primeiro deles é a aprovação da Lei nº 13.680, que permitiu a comercialização de queijos produzidos com leite cru, fora das delimitações territoriais do estado de Minas Gerais, impulsionando um nicho já existente, potencializando a capacidade produtiva local. Ademais, o segundo aspecto é o reconhecimento cultural do processo de produção desse queijo pelo Instituto do Patrimônio Histórico e Artístico Nacional (IPHAN), tornando-se patrimônio cultural (IPHAN, 2008). Já o terceiro aspecto é o título de indicação de origem, registrado pelo Instituto Nacional de Propriedade Industrial, mas ainda contemplando apenas queijos produzidos na Serra da Canastra e na região do Serro (INPI) (EMBRAPA, 2019, 2021; Kamimura et al., 2019; Penna, Gigante e Todorov, 2021).

Apesar da produção de queijos ter crescido no ano de 2020, o consumo, infelizmente não acompanhou essa tendência, incluindo os queijos artesanais, produzidos no estado de Minas Gerais. O grande motivo para a queda do consumo desse derivado são as medidas restritivas empregadas pela pandemia da COVID-19, ocasionando o fechamento de restaurantes, lojas de conveniência e redes de *food service*, levando em consideração que um terço da produção brasileira de queijos é destinada ao consumo de alimentos fora do lar (SCOT CONSULTORIA, 2020). Além disso, laticínios queijeiros tiveram uma redução de até 50% em seu faturamento, devido uma menor oferta de matéria prima (ABIC, 2021; EMBRAPA, 2021).

2.2.3 Características gerais: perfil microbiológico, físico-químico e sensorial

O queijo Minas artesanal, por definição, é um produto lácteo elaborado com leite integral fresco e cru e com características de identidade e qualidade específicas. Além disso, o produto apresenta consistência firme, cor e sabor próprios, massa uniforme e isenção de corantes e conservantes, com ou sem olhaduras mecânicas, conforme a tradição histórica e cultural da região do estado onde foi produzido (BRASIL, 2018).

O início do processamento do queijo Minas artesanal deve acontecer até 90 minutos após o início da ordenha e a produção deve ser com leite que não tenha sofrido tratamento térmico, utilizando-se como ingredientes culturas lácticas endógenas, denominada de “pingo”, o qual origina-se do soro drenado de queijos previamente preparados e é armazenada em temperatura ambiente (aproximadamente 25 °C) para ser utilizada na fabricação de queijos no dia seguinte, coalho e sal (BRASIL, 2018; CASTRO e colab., 2016).

Diante disso, o Conselho Consultivo do Instituto do Patrimônio Histórico e Artístico Nacional (IPHAN) aprovou em 15 de maio de 2008, por aclamação, o registro do Modo Artesanal de Fazer o Queijo de Minas como patrimônio imaterial brasileiro. O IPHAN inventariou as regiões do Serro, Serra da Canastra e Serra do Salitre (Cerrado), onde predominam fazendas que mantêm a tradição de fazer um queijo reconhecido mundialmente como “artesanal tipo Minas” Cada uma dessas regiões forjou um modo de fazer próprio, expressado na forma de manipulação do leite, dos coalhos, do soro fermento e das massas, na prensagem, na cura e até no comércio (IPHAN, 2008).

Alguns fatores contribuem para a singularidade do queijo Minas artesanal (QMA), tais como: (1) o *terroir* obtido devido ao clima ameno, altitude, pastagens nativas e águas de montanha, (2) leite de vaca integral cru e fresco, (3) o uso do “pingo”, responsável pelas características sensoriais dos produtos da região demarcada. A composição da microbiota do “pingo” é característica de cada região produtora de QMA. Estudos de ecologia microbiana de diversas regiões foram realizados e observaram uma variabilidade populacional dentre as regiões, bem como entre os produtores da mesma região, de forma que o gênero *Lactobacillus* spp. foi o mais abundante, devido a sua resistência a baixos pH e altas concentração de sal (BORELLI, B M, 2006; BORELLI, Beatriz Martins e colab., 2016; KAMIMURA, Bruna A. e colab., 2020; RESENDE e colab., 2011).

Além dessa variabilidade na cultura endógena, há uma variabilidade da microbiota dentre os queijos das regiões. Por exemplo, Resende e colaboradores (2011) estudaram a ecologia microbiana em 18 fazendas localizadas na Serra da Canastra de forma que obteve uma variação, pela técnica independente de cultura, sequenciamento 16S e 23 S r RNA, revelando um prevalência de *Lactobacillus* (37,9%), *Lactococcus* (34,2%) e *Enterococcus* (21,5%). Além

de relatarem, uma variabilidade qualitativa, descreveram uma variabilidade quantitativa e averiguaram a presença de *Streptococcus*, *Weissella* e *Staphylococcus* e espécies como, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus gasseri*, *Lactobacillus johnsonii*, *Streptococcus gallolyticus*, *Lactococcus lactis*, *Corynebacterium*, *Lactobacillus delbruekii* subsp . *lactis*, *Streptococcus salivarius* e *Enterococcus faecium* (KAMIMURA, Bruna A. e colab., 2020; MARGALHO e colab., 2020; NÓBREGA, 2012; PERIN e colab., 2017; VALE e colab., 2018).

Classificados como um queijo semiduro, seu teor de umidade deve ser de até 45,9% (BRASIL. GOVERNO DO ESTADO DE MINAS GERAIS., 2008). Diversos trabalhos caracterizaram queijos minas artesanais, dos quais obtiveram valores médios de 44,9% de umidade, 0,5% de acidez titulável, 18,5% de proteína, 23,6% de gordura e 1,9% de cloretos (DA SILVA, Nayara Cristina e colab., 2012; NARIMATSU e colab., 2003; OLIVEIRA e colab., 2013). Além disso, a microbiota pode influenciar as características físico-químicas dos queijos, principalmente associados ao sabor e aroma.

Dessa maneira, os queijos minas artesanais são geralmente atribuídos com sabor amargo e salgado, mas devido a variabilidades de suas características, outros podem apresentar sabor azedo, amanteigados e rançoso. Além disso possuem perfis de textura, variáveis, sendo que a maioria se caracteriza com uma textura cremosa e mole, por dentro e duros e firmes por fora. Essas características que impulsionam a aceitação dos QMA (BEMFEITO e colab., 2016; DE JESUS FILHO e colab., 2021; NOGUEIRA e colab., 2021).

2.3 Aspectos legais da produção de Queijo Minas Artesanal

As normas que regem as produções e a comercialização de queijos no Brasil eram concentradas na Regulação da inspeção industrial e sanitária de produtos de origem animal (RIISPOA). A primeira legislação a abordar a maturação de queijos produzidos a partir de leite cru no país foi o decreto aprovado nº 30,691 de 29 de agosto de 1952, o qual regulamentava a inspeção industrial e sanitária de produtos de origem animal da qual foi sofrendo alterações ao longo dos anos (BRASIL, 1952).

De acordo com o Decreto, legalmente tolerava-se o comércio interestadual do QMA após 10 dias de fabricação, entretanto, na prática, não havia queijarias formalizadas de queijo minas artesanal e a norma não detalhava a forma de maturação dos queijos. Além disso, não havia distinção entre as variedades dos queijos, onde todos recebiam a rotulagem “queijo Minas” (EMBRAPA, 2018).

Em 1996, através do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento por meio da portaria nº146 de 7 de março de 1996, houve alteração no período mínimo de dez dias de maturação definido anteriormente pelo RISPOA, exigindo então, a maturação dos queijos produzidos a partir de leite cru por no mínimo 60 dias (BRASIL., 1996). Apesar disso, o período de 60 dias de maturação era incompatível com a técnica de processamento dos queijos tradicionais produzidos em Minas Gerais, sendo que, após esse período é possível observar alterações sensoriais nos queijos artesanais (endurecimento e ressecamento) levando a perda de identidade do produto e baixa aceitação pelo consumidor. Sendo assim, ainda permaneceu sem amparo legal a produção do QMA no Brasil.

Tendo em vista a falta de amparo legal da produção de QMA, a fim de regularizar o comércio, a lei estadual nº 14,185 de 31 de dezembro de 2002, dispunha sobre o processo de produção de queijo, padrões microbiológicos. No entanto ainda não detalhavam o período de maturação (EMATER, 2002) . O desamparo foi contornado pela Instrução Normativa nº 57, possibilitando a produção de queijo de leite cru com menos de 60 dias de maturação. De acordo com a legislação, esse período poderia ser alterado somente após a realização de estudos científicos que comprovassem a qualidade e inocuidade do produto no período de maturação proposto (BRASIL, 2011).

Em 2013, por meio da instrução normativa nº 30 de 7 de agosto de 2013 e a portaria nº1305 de 30 de abril de 2013, o governo federal autorizou competência aos órgãos municipais e estaduais atestar os estudos científicos que comprovem a necessidade de maturação dos queijos por período menor que 60 dias. Diante disso, a comercialização do queijo minas artesanal foi autorizado em todos os pais, desde que cumpra o período de maturação estabelecido pela legislação, que seria de 17 dias, para QMA da região do serro, e 22 dias para as demais regiões (BRASIL, 2013; IMA, 2013).

A partir desse momento os órgãos públicos responsáveis pela institucionalização do QMA, desenvolveram maneiras de identificar esse tradicional produto para a distribuição em todo território nacional, um selo único com a indicação de arte a partir do decreto nº 9.918 de 18 de julho de 2019, que regulamentou a Lei nº 13.680 de 14 de julho de 2018 (Figura 3) (BRASIL., 2019; Brasil, 2018).

Figura 3 - Selo arte em versão negativa institucionalizado pelo IMA a partir da Lei estadual nº13.680 de 14 de julho de 2018.



Fonte: IMA(2018).

Diante do exposto, é possível inferir quanto a contrariedade e complexidade da legislação que abrange a produção e comércio do Queijo Minas Artesanal, tanto no âmbito estadual, quanto nacional. Na Tabela 1 é apresentado um resumo, a fim de organizar as principais legislações pertinentes em ordem cronológica.

Tabela 1. Principais legislações referentes a produção e comércio do queijo minas artesanal de 1952 a 2022.

Data	Norma	Ementa
29 de março de 1952	Decreto nº 30.691	Aprova o novo Regulamento da Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal.
07 de março de 1996	Portaria nº 146	Aprovar os Regulamentos Técnicos de Identidade e Qualidade dos Produtos Lácteos.
28 de novembro de 2000	Resolução nº 7	Critérios de Funcionamento e de Controle da Produção de Queijarias, para seu relacionamento junto ao Serviço de Inspeção Federal.
31 de janeiro de 2002	Lei nº 14.185	Critérios de Funcionamento e de Controle da Produção de Queijarias, para seu relacionamento junto ao Serviço de Inspeção Federal.
29 de outubro de 2002	Portaria nº 546	Identifica a região do Serro como produtora do Queijo Minas Artesanal.

10 de junho de 2003	Portaria n° 546	Identifica a região do Araxá como produtora do Queijo Minas Artesanal.
14 de novembro de 2004	Portaria n° 694	Identifica a região da Serra da canastra como produtora do Queijo Minas Artesanal.
03 de novembro de 2009	Portaria n° 2022	Identifica a região do Campo das Vertentes como produtora do Queijo Minas Artesanal.
15 de dezembro de 2011	Instrução normativa n° 57	Dispõe sobre o período de maturação dos queijos artesanais tradicionalmente elaborados a partir de leite cru.
18 de dezembro de 2012	Lei estadual n° 20.549	Dispõe sobre a produção e a comercialização dos queijos artesanais de Minas Gerais. (Revogado pela lei n° 23.157 de 18 de dezembro de 2018).
07 de agosto de 2013	Instrução normativa n° 30	Permite 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.
30 de abril de 2013	Portaria n° 1.305	Estabelece diretrizes para a produção do queijo minas artesanal.
13 de fevereiro de 2014	Portaria n° 1.397	Identifica a região do Triângulo mineiro como produtora do Queijo Minas Artesanal.
29 de agosto de 2014	Portaria n° 1.428	Identifica a região do Serra do salitre como produtora do Queijo Minas Artesanal.
27 de maio de 2017	Portaria n° 1736	Dispõe sobre o período de maturação do Queijo Minas Artesanal e altera o a Portaria n° 1.305.
14 de maio de 2018	Lei n° 13.680	Altera a Lei n° 1.283, de 18 de dezembro de 1950, para dispor sobre o processo de fiscalização de produtos alimentícios de origem animal produzidos de forma artesanal.

18 de dezembro de 2018	Lei nº 23.157	Dispõe sobre a produção e a comercialização dos queijos artesanais de Minas Gerais.
18 de junho de 2019	Lei nº 13.860	Dispõe sobre a elaboração e a comercialização de queijos artesanais e dá outras providências.
08 de agosto de 2019	Resolução nº 24	Dispõe sobre a delegação de competência ao Instituto Mineiro de Agropecuária – IMA, para os fins que menciona.
14 de agosto de 2019	Portaria nº 1.937	Dispõe sobre a habilitação sanitária dos queijos artesanais e da concessão do selo Arte às queijarias com habilitação sanitária no IMA
10 de dezembro de 2019	Instrução normativa nº 67	Estabelecer os requisitos para que os Estados e o Distrito Federal realizem a concessão do Selo Arte, aos produtos alimentícios de origem animal produzidos de forma artesanal
23 de dezembro de 2019	Instrução normativa nº 73	Estabelecer, em todo o território nacional, o Regulamento Técnico de Boas Práticas Agropecuárias destinadas aos produtores rurais fornecedores de leite para a fabricação de produtos lácteos artesanais, necessárias à concessão do selo ARTE.
26 de março de 2020	Portaria nº 1.969	Dispõe sobre a produção de Queijo Minas Artesanais em queijarias e entrepostos localizados dentro de microrregiões definidas e para as demais regiões do Estado, caracterizadas ou não como produtora de Queijo Minas Artesanal.
26 de novembro de 2020	Portaria nº 2016	Identifica a Região Serras da Ibitipoca como produtora do Queijo Minas Artesanal e Revoga a Portaria IMA nº 1834, de 04 de julho de 2018.
07 de abril de 2022	Portaria nº 2051	Define o período de Maturação do Queijo Minas Artesanal produzido nas microrregiões de Araxá, Campo das Vertentes, Canastra, Cerrado, Serra do Salitre, Serro e Triângulo Mineiro.
19 de abril de 2022	Portaria nº 2141	Identifica a Região Entre Serras da Piedade ao Caraça como produtora de Queijo Minas Artesanal
22 de abril de 2022	Portaria nº 2129	Identifica a Região de Diamantina como produtora de Queijo Minas Artesanal.

21 de junho de 2022	Decreto nº 11099	Regulariza formas de fiscalização e comercialização, através do selo “Queijos artesanais”.
16 de dezembro de 2022	Portaria nº 531	Estabelece requisitos para concessão dos selos ARTE e Queijo Artesanal pelos órgãos de agricultura e pecuária federal, estaduais, municipais e distrital
30 de dezembro de 2022	Resolução de nº 42	Reconhecimento da variedade do Queijo Minas Artesanal de Casca Florida.

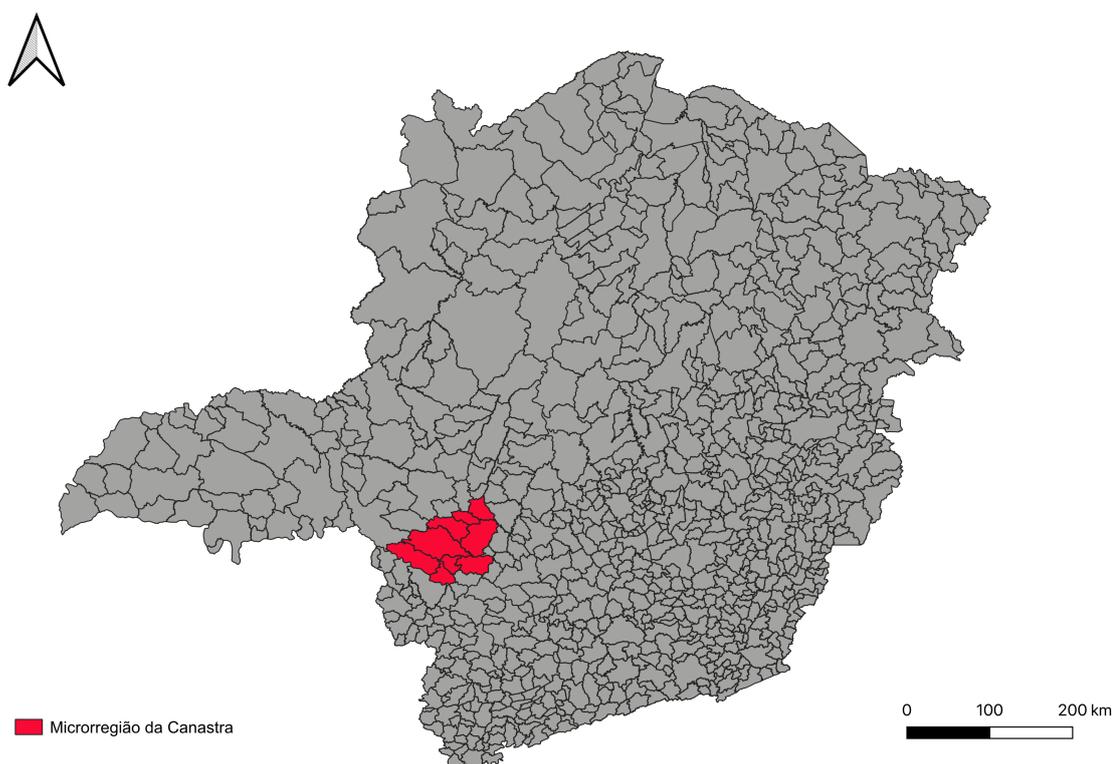
2.4 Queijo minas artesanal da região da Canastra

A Serra da Canastra localiza-se no sudoeste do estado de Minas Gerais, e suas coordenadas apontam para 47° 30’ de longitude Oeste, 45° 30’ de longitude Leste e 19° 45’ a 20° 34’ de latitude Sul. Engloba cidades como, Bambuí, Delfinópolis, Medeiros, Piumhi, São Roque de Minas, Tapiraí, Vargem Bonita e São João Batista do Gloria. Terra privilegiada pela localização próxima a grandes centros consumidores, pela grande quantidade de água e pelo clima ameno, a região tem na agropecuária uma das principais fontes de riqueza (KAMIMURA, Bruna A. e colab., 2019).

Segundo informações fornecidas pela Emater, em 2018, já existiam na região da Serra da canastra, cerca de 1350 produtores de QMA, dos quais 48 estão devidamente cadastrados no IMA. Os produtores cadastrados estão distribuídos em Medeiros, Bambuí, São roque de minas, Vargem bonita, Piumhi e Tapiraí (IMA., 2018).

O queijo da Canastra está entre os mais antigos, tradicionais e famosos queijos produzidos com leite cru em pequena escala (DORES e colab., 2013). Os queijos manufaturados desta região possuem características descritas como consistência semidura com tendência a maciez de natureza manteigosa, com textura compacta de cor branca amarelada e uma fina crosta, amarelada e sem trincas. Geralmente são cilíndricos, com altura de 4 a 6 cm e um diâmetro variando entre 15 e 17 cm e peso médio de 1,0 a 1,2 kg. O odor e sabor são ligeiramente ácidos e não picantes agradáveis (EMATER, 2023; EMATER., 2004). Essas características atestadas pela EMATER, foram exploradas e comprovadas por diferentes estudos (BEMFEITO e colab., 2016; NOGUEIRA e colab., 2021).

Figura 4 - Mapa da região da microrregião da Serra da Canastra.



Fonte: Do autor (2023).

A microbiota desses queijos é diversa e influenciada por fatores abióticos, incluindo a altitude da região de produção, que varia entre 637 a 1485 m (RESENDE e colab., 2011; SANT'ANNA e colab., 2019a). Este tipo de queijo foi caracterizado pela prevalência de *Lactococcus*, seguido de *Lactobacillus* (*L. casei*, *L. brevis*, *L. hilgardii*, *L. paracasei*, *L. plantarum*, *L. paraplantarum*, *L. rhamnosus*) e *Leuconostoc*. Além disso, outros microrganismos também foram encontrados, como *E. faecalis* e *Weissella paramesenteroides*. Apesar da presença desses microrganismos, o aparecimento de microrganismos contaminantes também foi encontrado *Staphylococcus* e *Escherichea coli* (BORELLI, B M, 2006; BORELLI, Beatriz Martins e colab., 2016; CAMPOS e colab., 2021; KAMIMURA, Bruna A. e colab., 2020; KORNACKI e colab., 2015; PENNA e colab., 2021; PERIN e colab., 2017) .

2.5 Processo de produção do queijo minas artesanal

A legislação mineira por meio da Lei 23.157, de 18 de dezembro de 2018 dispõe sobre a produção e a comercialização dos queijos artesanais de Minas Gerais (BRASIL, 2018; EMATER., 2004), que devem seguir as seguintes fases: 1) filtração do leite; 2) adição de cultura endógena (“Pingo”) e coalho; 3) coagulação; 4) corte da coalhada; 5) mexedura; 6) dessoragem;

7) prensagem; 8) salga seca; 9) maturação. A principal diferença entre os queijos artesanais de Minas produzidos nas diferentes regiões é a prensagem. Os queijos fabricados na região do Serro são prensados manualmente (com as mãos), enquanto os queijos fabricados nas microrregiões de Canastra, Cerrado, Araxá e Campo das Vertentes são prensados com auxílio de gaze. Essa diferença na etapa de prensagem está diretamente relacionada ao tempo de maturação dos queijos. No caso dos queijos do Serro, obtém-se maior concentração de lactose no produto, o que permite uma produção mais significativa de ácido pelas BALs, impossibilitando o desenvolvimento de microrganismos patogênicos e menor tempo de amadurecimento. Por outro lado, os queijos produzidos nas demais microrregiões apresentam geralmente um período de maturação de 22 dias, embora o tempo de maturação de cada queijo seja particular de cada região e mesmo do queijeiro (JÚNIOR e colab., 2014; KAMIMURA, Bruna A. e colab., 2019).

2.6 Maturação do queijo minas artesanal

O tempo de cura do queijo feito a partir de leite cru é definido com base no processo tecnológico de produção de cada variedade (BRASIL, 2018). Do ponto de vista microbiológico, químico e bioquímico o processo de maturação dos queijos envolve interações ecológicas (MAYO e colab., 2021). Na etapa de maturação, as principais alterações físico-químicas que controlam o crescimento de microrganismos em queijos, ocorrem em função do conteúdo de água, da concentração de sal e do pH do meio (CASTRO e colab., 2016).

No início da maturação a microbiota endógena, que tem a sua origem ainda na fabricação do queijo, de forma que as bactérias lácticas iniciadoras (BALI), presentes no “pingo”, crescem rapidamente e produzem ácidos orgânicos no leite. Além disso, devido ao crescimento acelerados dessas bactérias iniciadoras, lise celular pode ocorrer liberando enzimas proteolíticas, que auxiliaram no processo de desenvolvimento do sabor e na regulação do processo de maturação (FOX, Patrick F. e colab., 2017; IRLINGER e MOUNIER, 2009).

Os ácidos orgânicos produzido serão utilizados logo nos primeiros dias de maturação, por leveduras e fungos filamentosos, categorizando uma relação de competição (microrganismos competem por nutrientes e recursos energéticos de uma maneira que afeta negativamente a ambos) e amensalismo (microrganismo que afeta negativamente outro sem ser ele próprio afetado) de forma a colonizarem as superfícies do queijo, utilizando como principal fonte de carbono o lactato. Além disso, pode ocorrer a formação de metabolitos alcalinos, como amônia, a partir da desaminação de aminoácidos. Esse processo leva a desacidificação da casca

/ superfície do queijo, permitindo a presença de comunidade bacterianas menos tolerantes a ácidos, exemplo dessas são *Arthobacter arilaitensis*, *Brevibacterium aurantiacum*, *Brevibacterium linense*, *Corynebacterium casei* (MAYO e colab., 2021; RADEMAKER e colab., 2005).

Durante a maturação ocorre uma dinâmica de crescimento favorável entre as leveduras e bactérias. De forma que microrganismos secundários são responsáveis pelo desenvolvimento de sabores e aroma, através da produção de compostos como CO₂, propionato e acetato, por exemplo. Em contraste com as bactérias lácticas iniciadoras, as bactérias lácticas não iniciadoras (BALNI), em queijos fabricados com leite cru, também estão presentes, de forma que seu crescimento é rápido e a população é considerada heterógena, devido à presença de fontes de carbono, como citrato e galactose, e/ou produtos da lise celular das BALI (BUDINICH e colab., 2011). Esse comportamento pode ser descrito como mutualismo (microrganismos envolvidos se beneficiam de suas interações). A presença de *L. casei*, *L. plantarum* e *L. curvatus* é devido a habilidade de sobreviver a altas concentrações de sal e ácido, bem como a capacidade de crescer na ausência de oxigênio, promulgado pela matriz tridimensional do queijo (FOX, Patrick F. e colab., 2017).

Um exemplo claro de culturas secundárias em queijos minas artesanais foi relatado, *Streptococcus* e *Lactococcus*, que apresentaram alta abundância relativa nos queijos da Serra da Canastra, sugerindo vantagens competitivas em relação a outros gêneros bacterianos ao longo do curto amadurecimento desses queijos (~ 21 dias) (KAMIMURA, Bruna A. e colab., 2020). Essa protocoperação depende da proteólise realizada pela BALNI, cuja atividade proteolítica fornece aminoácidos (MAYO e colab., 2021). Essas interações culminam na segurança microbiológica do queijo minas artesanal, por que a maturação desempenha um papel muito importante na diversidade microbiana, características sensoriais e físico-química dos queijos e diminuem o risco para o consumo humano (CAMPOS e colab., 2021; FUKA e colab., 2013).

2.7 Patógenos de origem alimentar e Doenças transmitidas por água e alimento (DTHA) em queijos

Doenças de transmissão hídrica e alimentar (DTHA) são causadas pela presença de bactérias, vírus ou mesmo parasitas presentes nos alimentos e podem causar doenças graves como intoxicação alimentar (FOX, Edward M. e colab., 2018). De acordo com a *Food and*

Drug Administration (FDA), os patógenos transmitidos por alimentos são categorizados de acordo com os alimentos específicos que são consumidos (BAL e colab., 2017; FDA, 2023).

Nos queijos, embora caracterizados como seguros para consumo, têm sido implicados em surtos de origem alimentar associados a sintomas graves e alta taxa de letalidade. Os patógenos transmitidos por alimentos no leite cru se originam do ambiente da fazenda e são excretados diretamente do úbere de animais infectados, enquanto nas fábricas de laticínios os patógenos podem entrar através do leite cru contaminado, colonizar o ambiente da fábrica de laticínios e, conseqüentemente, contaminar os produtos lácteos. Durante o manuseio da matéria prima e seu processamento a contaminação pode vir através dos manipuladores (KOUSTA e colab., 2010; LEDO e colab., 2019; LOURENCO e colab., 2020).

Com essa infinidade de maneiras de haver contaminação no processo de produção, a presença de microrganismos patogênicos foi relatada: *Listeria monocytogenes*, *Salmoella sp.*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichea coli* (CAMARGO e colab., 2021; CAMPOS e colab., 2021). *Listeria monocytogenes*, bactéria gram positiva, possui um histórico de difícil controle na produção de queijos, pois pode sobreviver e crescer em grande faixa de temperaturas (-0,4 a 50°C), baixo pH e altas concentrações de sal. Além disso é causadora de listeriose, que pode afetar diversos sistemas corporais através de diferentes síndromes como a doença do sistema nervoso central (SNC), sepse, endocardite, gastroenterite e infecções focais (SCHLECH, 2019). Devido a essas ocorrências a taxa de mortalidade pode chegar a 24%. Estudos relataram que a presença desse patógeno está associado a um grande caso de recall de queijos (CHURCHILL e colab., 2019; NOORDHOUT e colab., 2014).

Patógenos pertencentes ao gênero *Salmonella*, bactérias Gram-negativas, móveis, são responsáveis por causar Salmonelose. Sorotipos foram associadas à contaminação de alimentos com baixa umidade e relatada como a causa de surtos em queijos, incluindo queijos de leite cru. Esse gênero possui mais de 2.600 sorotipos diferentes de *Salmonella* e muitos deles com a capacidade de induzir gastroenterite caracterizada tipicamente por sintomas iniciais como náuseas e vômitos que podem evoluir para diarreia, dor abdominal e febre (LOURENCO e colab., 2020; RANGEL-ORTEGA e colab., 2023).

Entre a população de *Escherichia coli*, bactérias gram-negativas, bem conhecidas da microbiota gastrointestinal normal de uma ampla gama de animais, geralmente inofensiva, existem alguns sorotipos que são patogênicos. Estes podem causar doenças graves, mesmo quando presentes em números baixos (LORENÇO e colab., 2021). O sorotipo STEC *E. coli* O157:H7 está associado à maioria dos surtos, podendo causar doença na dose de 5 a 50 células, de forma a causar uma variedade de mecanismos infecciosos e produtores de

toxinas. Os sintomas variam de acordo com a cepa de *E. coli* encontrada e a resistência do indivíduo a tal doença. Bebês, crianças pequenas, idosos e imunocomprometidos são geralmente mais suscetíveis a infecções (FARROKH e colab., 2013; FRÉTIN e colab., 2020; KOUTSOUMANIS e colab., 2020).

Staphylococcus aureus é uma bactéria Gram-positiva, imóvel, coagulase-positiva, e é um dos principais patógenos transmitidos por alimentos e está associado a contaminação de queijos artesanais, principalmente, os produzidos com a partir de leite cru (RANGEL-ORTEGA e colab., 2023). Esse patógeno é comumente encontrado em mucosas de humanos e animais e a contaminação pode ocorrer através da matéria prima, bem como pelo seu manuseio. Além do papel indicador de higiene, a intoxicação alimentar estafilocócica resulta do consumo de alimentos nos quais estafilococos coagulase positivos (CPS), cresceram e produziram enterotoxinas estafilocócicas (SEs), causando um rápido aparecimento de sintomas que incluem náuseas e vômitos violentos, com ou sem diarreia (AGUIAR e colab., 2022; SILVA, Mirian P. e colab., 2021).

Não é possível estimar a carga de DTHA em todo o mundo, porque muitos países, especialmente os países em desenvolvimento, não possuem sistemas que exijam que os médicos notifiquem as autoridades de saúde do governo sobre a ocorrência de doenças transmitidas por alimentos (MCENTIRE, 2013). No Brasil, a Secretaria de Vigilância em Saúde registrou 2.504 surtos de DTHA entre 2016 e 2019, com 37.247 acometidos e 38 óbitos. Do total de surtos, 541 (21,6%) foram notificados com os agentes etiológicos identificados. Em 11,5% o agente etiológico foi identificado como *S. aureus*. Do total de focos 35,7%, havia informação sobre o tipo de alimento envolvido, com leite e derivados (9,06%; 81 surtos) sendo responsável (BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2020). Até onde sabemos, informações sobre a frequência com que queijos artesanais brasileiros de leite cru foram implicados em intoxicação alimentar estafilocócica não existem em dados oficiais de vigilância epidemiológica no Brasil (AGUIAR e colab., 2022; CARVALHO e colab., 2019).

A presença desses microrganismos indesejáveis são um perigo contínuo para a saúde comunitária, afetando negativamente as economias dos países emergentes e subdesenvolvidos (WHO, 2023). A presença de patógenos estão ligados diretamente com desenvolvimento socioeconômico, a saúde comunitária e as despesas crescentes, o que apresentou uma alta demanda pela inspeção (JIA, Xue-Xia e colab., 2022; YANG e colab., 2022). A melhor forma de impedir que esses patógenos cheguem a produtos prontos para consumos ou fórmula infantis é a aplicar as boas práticas de fabricação, orientar produtores de leite e derivados por toda a cadeia produtiva e utilizar a legislação como padrão microbiológico de qualidade.

2.8 Qualidade e padrões microbiológicos

Os principais microrganismos patogênicos encontrados no queijo são: *Salmonella* spp., *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes* e *Staphylococcus aureus*. No processo de produção do QMA, estes microrganismos são eliminados através do processo de maturação garantindo a segurança alimentar dos QMA (ANDRETTA e colab., 2019; CAMPOS e colab., 2021).

A RDC nº 12, de 02 de janeiro de 2001, regia os padrões microbiológicos para alimentos, onde apresenta os valores para queijos de média umidade: entre 36% a 46%. No entanto uma atualização da legislação foi implementada através da RDC nº 724, de 1º de julho de 2022, que dispõe sobre os padrões microbiológicos dos alimentos. A aplicação ocorre nos termos da resolução de diretoria através da instrução normativa nº 161, de 1º de julho de 2022, de forma que os parâmetros para queijo minas artesanal, o qual a umidade, segundo a Lei estadual nº 23.157, para esse tipo de queijo estar abaixo de 45,9% são apresentados na Tabela 2 (Brasil, 2022; BRASIL, 2018).

Tabela 2. Padrões microbiológicos para inspeção de queijo minas artesanal Instrução normativa nº 161, de 1º de julho de 2022.

Microrganismo/Toxina/Metabólito	Tolerância para amostra representativa			
	n	C	m	M
<i>Escherichia coli</i> / g	5	2	10	10 ²
Enterotoxina estafilocócicas (ng/g)	5	0	Ausente	-
Staphylococcus coagulase positiva	5	2	10 ²	10 ³
<i>Salmonella</i> /25 g	5	0	Ausente	-
<i>Listeria monocytogenes</i> /g	5	0	10 ²	-

Estudos avaliando os queijos artesanais brasileiros têm demonstrado diversos problemas relacionados à qualidade microbiológica e físico-química desses produtos (CAMPOS e colab., 2021; CASTRO e colab., 2016; KOUSTA e colab., 2010; NOGUEIRA VIÇOSA e colab., 2019a). As falhas na aplicação de boas práticas agropecuárias e de fabricação, a utilização de matéria prima de baixa qualidade e a produção sem condições higiênico-sanitárias apropriadas são alguns dos fatores que comprometem a qualidade dos queijos artesanais (GRACE e colab., 2020).

Apesar do processo de maturação de mínimo de 14 dias estabelecido pela legislação (IMA. INSTITUTO MINEIRO DE AGROPECUÁRIA, 2021), produções de queijos minas artesanais foram reportadas em não conformidade com a legislação, levando em consideração produtores registrados ou não. Além disso, foram encontradas enterotoxinas estafilocócicas presentes nas amostras avaliadas (CAMPOS e colab., 2021).

Melhorias nas práticas de higiene são necessárias para reduzir os indicadores microbiológicos em queijos com no mínimo de 14 dias de maturação, além da evidente necessidade de orientação constante dos produtores de toda a cadeia produtiva do queijo. Atitudes como higiene pessoal dos ordenhadores, higienização dos tetos dos animais, sanificação dos utensílios e controle de qualidade da água contribuem para a melhoria da qualidade físico-química do queijo artesanal (CAMPOS e colab., 2021; KAMIMURA, Bruna A. e colab., 2020; LEDO e colab., 2019; PINTO e colab., 2009).

3 CONSIDERAÇÕES GERAIS

O uso de leite cru e a cultura endógena utilizado para produção do queijo minas artesanal, desencadeou diversos estudos para avaliar a inocuidade desse produto. O processo de maturação está vinculado a melhora da qualidade microbiológica, a partir da inativação total de patógenos de origem alimentar ou com a diminuição de riscos para o consumidor. O sucesso desse processo está totalmente vinculado a comunidade microbiológica existente, seja ela presente nas matérias primas, ou adicionada, através de uma cultura endógena, denominada pingo. Assim, através de reações bioquímicas, como a proteólise, lipólise, bem como a produção de compostos que auxiliam nesse processo de inocuidade são de suma importância de serem estudados, principalmente, porque os parâmetros físico-químicos influenciam na dinâmica de população de agentes microbiológicos que auxiliam nesse processo de maturação.

REFERÊNCIAS

ABIC. **Nem consumidores, nem pequenos produtores de leite estão felizes com o preço do leite no Brasil.** Disponível em: <https://www.abiq.com.br/noticias.asp?codigo_categoria=6&codigo_subcategoria=6>. Acesso em: 18 out 2021.

AGUIAR, Renata Amanda Carneiro e colab. **Graduate Student Literature Review: Enterotoxigenic potential and antimicrobial resistance of staphylococci from Brazilian artisanal raw milk cheeses.** Journal of Dairy Science, v. 105, n. 7, p. 5685–5699, Jul 2022.

ANDRETTA, M. e colab. **Microbial safety status of Serro artisanal cheese produced in Brazil.** *Journal of Dairy Science*, v. 102, n. 12, p. 10790–10798, Dez 2019.

BAL, B. e NAYAK, S. e DAS, A.P. Recent Advances in Molecular Techniques for the Diagnosis of Foodborne Diseases. *Nanotechnology Applications in Food*. [S.l.]: Elsevier, 2017. p. 267–285.

BEMFEITO, Raquel M. e colab. **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, Out 2016.

BOJNEC, Š e FERTŐ, I. **Export competitiveness of dairy products on global markets: The case of the European Union countries.** *Journal of Dairy Science*, v. 97, n. 10, p. 6151–6163, 2014.

BORELLI, B M. **Caracterização das bactérias lácticas, leveduras e das populações de Staphylococcus enterotoxigênicos durante a fabricação do queijo de minas curado produzido na Serra da Canastra-MG. 2006. 120f.** . [S.l.]: Tese (Doutorado em Microbiologia)-Instituto de Ciências Biológicas , 2006

BORELLI, Beatriz Martins e colab. **Traditional cheeses produced in Brazil: characterisation, production technologies and health implications.** *Food microbiology fundamentals, challenges and health implications*. New York: Nova Science Publishers, Inc, p. 161–189, 2016.

BRASIL. **Lei nº 13.680 de 14 de julho de 2018.** Disponível em: <[BRASIL. AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Instrução normativa nº 161 de 1º de julho de 2022.** Disponível em: <\[http://antigo.anvisa.gov.br/documents/10181/2718376/IN_161_2022_.pdf/b08d70cb-add6-47e3-a5d3-fa317c2d54b2\]\(http://antigo.anvisa.gov.br/documents/10181/2718376/IN_161_2022_.pdf/b08d70cb-add6-47e3-a5d3-fa317c2d54b2\)>. Acesso em: 26 abr 2023.](https://legislacao.presidencia.gov.br/atos/?tipo=LEI&numero=13680&ano=2018&ato=b91UTV61UeZpWTa4d#:~:text=ALTERA A LEI Nº 1.283,ANIMAL PRODUZIDOS DE FORMA ARTESANAL.>>.</p></div><div data-bbox=)

BRASIL. GOVERNO DO ESTADO DE MINAS GERAIS. **Decreto nº 44.864 de 01 de agosto de 2008.**

BRASIL. GOVERNO DO ESTADO DE MINAS GERAIS. **Lei estadual nº 23.157 de 18 de dezembro de 2018.** Disponível em: <<https://www.legisweb.com.br/legislacao/?id=372516>>.

BRASIL. MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, Pecuária e Abastecimento. **Decreto nº 9.918 de 18 de julho de 2019.** Disponível em: <<https://www.in.gov.br/web/dou/-/decreto-n-9918-de-18-de-julho-de-2019-198615217>>.

BRASIL. MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, Pecuária e Abastecimento. **Decreto nº 30,691 de 29 de agosto de 1952.** Disponível em: <<https://www.legisweb.com.br/legislacao/?id=29212>>.

BRASIL. MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, Pecuária e Abastecimento. **Instrução normativa nº 30 de 7 de agosto de 2013**. Disponível em: <https://www.in.gov.br/materia/-/asset_publisher/Kujrw0TZC2Mb/content/id/30808894/do1-2013-08-08-instrucao-normativa-n-30-de-7-de-agosto-de-2013-30808890>.

BRASIL. MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, Pecuária e Abastecimento. **Instrução normativa nº 57 de 15 de dezembro de 2011**. Disponível em: <https://www.normasbrasil.com.br/norma/instrucao-normativa-57-2011_78290.html>.

BRASIL. MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, Pecuária e Abastecimento. **Portaria n. 146 de 07 de março de 1996**. Disponível em: <<https://www.defesa.agricultura.sp.gov.br/legislacoes/portaria-mapa-146-de-07-03-1996,669.html>>.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Boletim Epidemiológico Vol. 51 Nº 32**. Disponível em: <<https://www.gov.br/saude/pt-br/centrais-de-conteudo/publicacoes/boletins/epidemiologicos/edicoes/2020/boletim-epidemiologico-svs-32.pdf/view>>. Acesso em: 21 maio 2023.

BUDINICH, M.F. e colab. **Growth of *Lactobacillus paracasei* ATCC 334 in a cheese model system: A biochemical approach**. *Journal of Dairy Science*, v. 94, n. 11, p. 5263–5277, Nov 2011.

CAMARGO, Anderson Carlos e colab. **Microbiological quality and safety of Brazilian artisanal cheeses**. *Brazilian Journal of Microbiology*, v. 52, n. 1, p. 393–409, 4 Mar 2021.

CAMPOS, Gabriela Zampieri e colab. **Microbiological characteristics of canastra cheese during manufacturing and ripening**. *Food Control*, v. 121, p. 107598, Mar 2021. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0956713520305144>>.

CARVALHO, Michelle de Medeiros e colab. **Traditional Colonial-type cheese from the south of Brazil: A case to support the new Brazilian laws for artisanal cheese production from raw milk**. *Journal of Dairy Science*, v. 102, n. 11, p. 9711–9720, Nov 2019.

CASTRO, R.D. e colab. **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 of Dairy Science*, v. 99, n. 8, p. 6086–6096, Ago 2016. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0022030216303502>>.

CHURCHILL, Katheryn J. e colab. **Prevalence of *Listeria monocytogenes* in Select Ready-to-Eat Foods—Deli Meat, Soft Cheese, and Packaged Salad: A Systematic Review and Meta-Analysis**. *Journal of Food Protection*, v. 82, n. 2, p. 344–357, Fev 2019.

DA SILVA, Nayara Cristina e TUNES, Risia May Matos e CUNHA, Márcio Ferraz. **Avaliação química de queijos Minas artesanais frescos e curados em Uberaba, MG**. *PUBVET*, v. 6, p. Art-1357, 2012.

DE JESUS FILHO, Milton e colab. **Key aroma compounds of Canastra cheese: HS-SPME optimization assisted by olfactometry and chemometrics**. Food Research International, v. 150, p. 110788, Dez 2021.

DELUIZ, Neise. **A globalização econômica e os desafios à formação profissional**. Boletim Técnico do Senac, v. 30, n. 3, p. 73–79, 2004.

DORES, Milene Therezinha Das e NOBREGA, Juliana Escarião Da e FERREIRA, Célia Lucia de Luces Fortes. **Room temperature aging to guarantee microbiological safety of Brazilian artisan Canastra cheese**. Food Science and Technology, v. 33, n. 1, p. 180–185, 20 Fev 2013.

EMATER. **Queijo Minas Artesanal: patrimônio cultural imaterial brasileiro**.

EMATER. EMPRESA DE ASSISTENCIA TECNICA E EXTENSÃO RURAL DO ESTADO DE MINAS GERAIS. **Caracterização da microregião da Canastra como produtora do queijo minas artesanal**. Disponível em: <https://www.emater.mg.gov.br/doc/intranet/upload/QUEIJO_HISTORICO/Caracterização do Queijo Canastra.pdf>.

EMATER. EMPRESA DE ASSISTENCIA TECNICA E EXTENSÃO RURAL DO ESTADO DE MINAS GERAIS. **Lei estadual nº 14.185 de 31 de janeiro de 2002**. Disponível em: <https://www.emater.mg.gov.br/portal.cgi?flagweb=site_tpl_queijo&id=3299>.

EMATER. EMPRESA DE ASSISTENCIA TECNICA E EXTENSÃO RURAL DO ESTADO DE MINAS GERAIS. **MINAS GERAIS PODERÁ RECONHECER MAIS UMA REGIÃO PRODUTORA DO QUEIJO MINAS ARTESANAL**. Disponível em: <https://www.emater.mg.gov.br/portal.do/site-noticias/minas-gerais-podera-reconhecer-mais-uma-regiao-produtora-do-queijo-minas-artesanal-/?flagweb=novosite_pagina_interna_noticia&id=25910>.

EMBRAPA. EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA. **ANUÁRIO leite 2019: novos produtos e novas estratégias da cadeia do leite para ganhar competitividade e conquistar os clientes finais**. Brasília: [s.n.], 2019. Disponível em: <<https://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/infoteca/handle/doc/1109959>>.

EMBRAPA. EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA. **ANUÁRIO leite 2021: saúde única e total**. Brasília: [s.n.], 2021. Disponível em: <<https://www.embrapa.br/busca-de-publicacoes/-/publicacao/1132875/anoario-leite-2021-saude-unica-e-total>>.

EMBRAPA. EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA. **Queijo Minas Artesanal: Valorizando a Agroindústria Familiar**. 23. ed. Brasília: [s.n.], 2018.

EMBRAPA. EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA. **GADO DE LEITE. Serra da Mantiqueira em Minas Gerais é reconhecida como região produtora de queijo artesanal**. Disponível em: <<https://www.embrapa.br/busca-de-noticias/-/noticia/53873549/serra-da-mantiqueira-em-minas-gerais-e-reconhecida-como-regiao-produtora-de-queijo-artesanal>>.

FARROKH, Choreh e colab. **Review of Shiga-toxin-producing Escherichia coli (STEC) and their significance in dairy production.** International Journal of Food Microbiology, v. 162, n. 2, p. 190–212, Mar 2013.

FDA. **Public Health Advisories from Investigations of Foodborne Illness Outbreaks.** Disponível em: <<https://www.fda.gov/food/outbreaks-foodborne-illness/public-health-advisories-investigations-foodborne-illness-outbreaks>>. Acesso em: 21 maio 2023.

FOX, Edward M. e JIANG, Yujun e GOBIUS, Kari S. **Key pathogenic bacteria associated with dairy foods: On-farm ecology and products associated with foodborne pathogen transmission.** International Dairy Journal, v. 84, p. 28–35, Set 2018.

FOX, Patrick F. e colab. Microbiology of Cheese Ripening. Fundamentals of Cheese Science. Boston, MA: Springer US, 2017. p. 333–390. Disponível em: <http://link.springer.com/10.1007/978-1-4899-7681-9_11>.

FRÉTIN, Marie e colab. **Robustness and efficacy of an inhibitory consortium against E. coli O26:H11 in raw milk cheeses.** Food Control, v. 115, p. 107282, Set 2020.

FUKA, Mirna Mrkonjić e colab. **Dynamics of Bacterial Communities during the Ripening Process of Different Croatian Cheese Types Derived from Raw Ewe's Milk Cheeses.** PLoS ONE, v. 8, n. 11, p. e80734, 20 Nov 2013.

GRACE, D e WU, F e HAVELAAR, A H. **MILK Symposium review: Foodborne diseases from milk and milk products in developing countries—Review of causes and health and economic implications*.** Journal of Dairy Science, v. 103, n. 11, p. 9715–9729, 2020.

IMA. **Queijos Artesanais.** Disponível em: <<http://ima.mg.gov.br/agroindustria/queijos-artesanais>>. Acesso em: 23 maio 2023.

IMA. INSTITUTO MINEIRO DE AGROPECUÁRIA. **Portaria nº 2051, de 07 de abril de 2021.** 2021. Disponível em: <<http://ima.mg.gov.br/files/1739/Ano-2021/18551/Portaria-n%C2%B0-2051,-de-07-de-abril-de-2021.pdf>>. Acesso em: 23 maio 2023.

IMA. INSTITUTO MINEIRO DE AGROPECUÁRIA. **Portaria nº 694, 17 de novembro de 2004.** Disponível em: <<https://www.gov.br/inpi/pt-br/servicos/indicacoes-geograficas/arquivos/cadernos-de-especificacoes-tecnicas/Canastra.pdf>>.

IMA. INSTITUTO MINEIRO DE AGROPECUÁRIA. **Portaria nº 1305 de 30 de abril de 2013.** Disponível em: <<https://www.legisweb.com.br/legislacao/?id=253925>>.

IMA. INSTITUTO MINEIRO DE AGROPECUÁRIA. **Portaria nº 1985 de 16 de junho de 2020.** Disponível em: <<http://ima.mg.gov.br/files/1706/Ano-2020/18013/Portaria-nº-1985,-de-16-de-junho-de-2020.pdf>>.

IMA. INSTITUTO MINEIRO DE AGROPECUÁRIA. **Portaria nº1986 de 16 de junho de 2020.** Disponível em: <<http://ima.mg.gov.br/files/1706/Ano-2020/18014/Portaria-nº-1986,-de-16-de-junho-de-2020.pdf>>.

IMA. INSTITUTO MINEIRO DE AGROPECUÁRIA. **Selo Arte**. Disponível em: <http://ima.mg.gov.br/index.php?preview=1&option=com_dropfiles&format=&task=frontfile.download&catid=1484&id=15421&Itemid=1000000000000>.

INPI. INSTITUTO NACIONAL DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL. **Identificação Geográfica - Canastra**. Disponível em: <<https://www.gov.br/inpi/pt-br/servicos/indicacoes-geograficas/explorador-de-indicacoes-geograficas>>. Acesso em: 22 maio 2023.

IPHAN. INSTITUTO DO PATRIMÔNIO HISTÓRICO E CULTURAL NACIONAL. **Queijo artesanal de Minas vira patrimônio cultural**. Disponível em: <<http://portal.iphan.gov.br/noticias/detalhes/2033/queijo-artesanal-de-minas-vira-patrimonio-cultural#:~:text=O%20Conselho%20Consultivo%20do%20Instituto,minas%20como%20patrim%C3%B4nio%20imaterial%20brasileiro.>>. Acesso em: 23 maio 2023.

IRLINGER, Françoise e MOUNIER, Jérôme. **Microbial interactions in cheese: implications for cheese quality and safety**. *Current Opinion in Biotechnology*, v. 20, n. 2, p. 142–148, Abr 2009.

JIA, Xue-Xia e colab. **Development and perspectives of rapid detection technology in food and environment**. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, v. 62, n. 17, p. 4706–4725, 23 Jun 2022.

JÚNIOR, Luiz Carlos Gonçalves Costa e colab. **Maturação do queijo minas artesanal da microrregião campo das vertentes e os efeitos dos períodos seco e chuvoso**. *Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes*, v. 69, n. 2, p. 111, 5 Maio 2014.

KAMIMURA, Bruna A. e colab. **Amplicon sequencing reveals the bacterial diversity in milk, dairy premises and Serra da Canastra artisanal cheeses produced by three different farms**. *Food Microbiology*, v. 89, p. 103453, Ago 2020. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0740002020300423>>.

KAMIMURA, Bruna A. e colab. **Brazilian Artisanal Cheeses: An Overview of their Characteristics, Main Types and Regulatory Aspects**. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, v. 18, n. 5, p. 1636–1657, 21 Set 2019.

KORNACKI, Jeffrey L. e GURTLER, Joshua B. e STAWICK, Bradley A. **Enterobacteriaceae, Coliforms, and Escherichia coli as Quality and Safety Indicators**. *Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods*. 8. ed. [S.l.]: American Public Health Association, 2015. .

KOUSTA, Maria e colab. **Prevalence and sources of cheese contamination with pathogens at farm and processing levels**. *Food Control*, v. 21, n. 6, p. 805–815, Jun 2010. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0956713509003235>>.

KOUTSOUMANIS, Kostas e colab. **Pathogenicity assessment of Shiga toxin-producing Escherichia coli (STEC) and the public health risk posed by contamination of food with STEC**. *EFSA Journal*, v. 18, n. 1, Jan 2020.

LEDO, James e colab. **Persistent challenges in safety and hygiene control practices in emerging dairy chains: The case of Tanzania**. *Food Control*, v. 105, p. 164–173, Nov 2019.

LORENÇO, Mário Sérgio e colab. **Valorization of polyphenols from stryphnodendron adstringens bark for use as a sustainable inhibitor of nitrogen volatilization in soil.** ACS Agricultural Science & Technology, 20 Out 2021. Disponível em: <<https://doi.org/10.1021/acsagscitech.1c00095>>.

LOURENCO, Antonio e colab. **Determination of the presence of pathogens and anthelmintic drugs in raw milk and raw milk cheeses from small scale producers in Ireland.** LWT, v. 130, p. 109347, Ago 2020.

MARGALHO, Larissa P. e colab. **Brazilian artisanal cheeses are rich and diverse sources of nonstarter lactic acid bacteria regarding technological, biopreservative, and safety properties—Insights through multivariate analysis.** Journal of Dairy Science, v. 103, n. 9, p. 7908–7926, Set 2020. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0022030220305336>>.

MAYO, Baltasar e colab. **Microbial Interactions within the Cheese Ecosystem and Their Application to Improve Quality and Safety.** Foods, v. 10, n. 3, p. 602, 12 Mar 2021.

MCENTIRE, Jennifer. **Foodborne Disease.** Infectious Disease Clinics of North America, v. 27, n. 3, p. 687–693, Set 2013.

MENESES, José Newton Coelho. **Queijo Artesanal de Minas.** Patrimônio Cultural do Brasil, 2006.

NARDY, Vinícius e DA ROCHA, Denis Teixeira e CARVALHO, Glauco Rodrigues. **Modelos de previsão para a produção brasileira de leite inspecionado.** 2019, [S.l.]: In: WORKSHOP DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA EMBRAPA GADO DE LEITE, 24., 2019 ..., 2019.

NARIMATSU, Agnes e colab. **Avaliação da proteólise e do derretimento do queijo prato obtido por ultrafiltração.** Ciência e Tecnologia de Alimentos, v. 23, p. 177–182, Dez 2003. NETTO, Marcos Mergarejo. **A geografia do queijo minas artesanal.** 2011. 420 f. Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, 2011.

NÓBREGA, J E. **Microbial biodiversity, physicochemical descriptors and sensory characteristics of artisan cheeses produced in the Serra da Canastra and Serro regions, Minas Gerais.** 2012. . [S.l.]: Doctoral thesis. Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Brazil. , 2012

NOGUEIRA, Thayane Sabino e colab. **Different types of packaging influence sensory profile of Canastra artisanal cheese.** Food Packaging and Shelf Life, v. 28, p. 100673, Jun 2021.

NOGUEIRA VIÇOSA, Gabriela e colab. **Impact of co-cultivation with Enterococcus faecalis over growth, enterotoxin production and gene expression of Staphylococcus aureus in broth and fresh cheeses.** International Journal of Food Microbiology, v. 308, p. 108291, Nov 2019.

- NOORDHOUT, Charline Maertens e colab. **The global burden of listeriosis: a systematic review and meta-analysis**. *The Lancet Infectious Diseases*, v. 14, n. 11, p. 1073–1082, Nov 2014.
- OLIVEIRA, D F e colab. **Physical-chemical characterization of Minas handmade cheeses produced in microregions different of Minas Gerais**. *Revista Brasileira de Economia Doméstica*, v. 24, n. 2, p. 185–186, 2013.
- PENNA, Ana Lucia Barretto e GIGANTE, Mirna Lucia e TODOROV, Svetoslav Dimitrov. **Artisanal Brazilian Cheeses—History, Marketing, Technological and Microbiological Aspects**. *Foods*, v. 10, n. 7, p. 1562, 6 Jul 2021.
- PERIN, Luana Martins e colab. **Bacterial ecology of artisanal Minas cheeses assessed by culture-dependent and -independent methods**. *Food Microbiology*, v. 65, p. 160–169, Ago 2017. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0740002016306086>>.
- PINTO, Maximiliano Soares e colab. **Survival of *Listeria innocua* in Minas Traditional Serro cheese during ripening**. *Food Control*, v. 20, n. 12, p. 1167–1170, Dez 2009.
- RADEMAKER, J.L.W. e colab. **The surface microflora dynamics of bacterial smear-ripened Tilsit cheese determined by T-RFLP DNA population fingerprint analysis**. *International Dairy Journal*, v. 15, n. 6–9, p. 785–794, Jun 2005.
- RANGEL-ORTEGA, Sarahi del Carmen e colab. **Biological control of pathogens in artisanal cheeses**. *International Dairy Journal*, v. 140, p. 105612, Mai 2023.
- RESENDE, M.F.S. e colab. **Queijo de minas artesanal da Serra da Canastra: influência da altitude das queijarias nas populações de bactérias acidolácticas**. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v. 63, n. 6, p. 1567–1573, Dez 2011. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0102-09352011000600039&lng=pt&tlng=pt>.
- RIBEIRO, J A. **Queijos do Brasil**. *Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes*, v. 14, n. 86, p. 33–34, 1959.
- ROGICK, A F. **Os laticínios e sua história**. *Laticínios—Separata do Volume*. [S.l: s.n.], 1960
- SANT'ANNA, Felipe Machado e colab. **Microbial shifts in Minas artisanal cheeses from the Serra do Salitre region of Minas Gerais, Brazil throughout ripening time**. *Food Microbiology*, v. 82, p. 349–362, Set 2019.
- SCHLECH, Walter F. **Epidemiology and Clinical Manifestations of *Listeria monocytogenes* Infection**. *Microbiology Spectrum*, v. 7, n. 3, 31 Maio 2019.
- SCOT CONSULTORIA. **Queijos: preços e consumo em tempos de covid-19**. Disponível em: <<https://www.scotconsultoria.com.br/noticias/cartas/52622/carta-leite---queijos:-precos-e-consumo-em-tempos-de-covid-19.htm>>.
- SILVA, Mirian P. e colab. **Presence and growth prediction of *Staphylococcus* spp. and *Staphylococcus aureus* in Minas Frescal cheese, a soft fresh cheese produced in Brazil**. *Journal of Dairy Science*, v. 104, n. 12, p. 12312–12320, Dez 2021.

SORIO, A. **Cadeia Agroindustrial do Leite no Brasil: diagnóstico dos fatores limitantes à competitividade**. Ministério da Indústria, Comércio Exterior e Serviços, 2018.

SPERS, Renata Giovinazzo e WRIGHT, James Terence Coulter e AMEDOMAR, André de Azevedo. **Scenarios for the milk production chain in Brazil in 2020**. Revista de Administração, v. 48, n. 2, p. 254–267, 2013.

TELLES, TIAGO S. e colab. **Milk production systems in Southern Brazil**. Anais da Academia Brasileira de Ciências, v. 92, n. 1, 2020.

VALE, Rosana Campos Do e RODRIGUES, Maria Paula Jansen e MARTINS, José Manoel. **Influência do tipo de fermento nas características físico-químicas de queijo Minas artesanal do serro – Minas Gerais, maturado em condições controladas**. Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes, v. 73, n. 2, p. 82–90, 13 Nov 2018. Disponível em: <<https://www.revistadoilct.com.br/riict/article/view/686>>.

VILELA, Duarte e colab. **A evolução do leite no Brasil em cinco décadas**. Revista de política agrícola, v. 26, n. 1, 2017.

WHO. WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Foodborne diseases**. Disponível em: <https://www.who.int/health-topics/foodborne-diseases#tab=tab_1>. Acesso em: 16 maio 2023.

YANG, Tao e colab. **When smartphone enters food safety: A review in on-site analysis for foodborne pathogens using smartphone-assisted biosensors**. Food Chemistry, v. 394, p. 133534, Nov 2022.

SEGUNDA PARTE

ARTIGO I - DIGITAIS MICROBIANAS BASEADAS EM PCR-DGGE PARA AVALIAÇÃO DA DINÂMICA MICROBIANA DA MATURAÇÃO DE QUEIJO MINAS ARTESANAL DA MICRORREGIÃO DA CANASTRA PRODUZIDOS DIFERENTES QUEIJARIAS

Artigo redigido conforme a norma para publicação periódica científica NBR 6022

RESUMO

Os queijos minas artesanais da região da canastra (QMA-MC) são produtos tradicionais devido ao seu processo de produção e maturação. Produzido com leite de vaca cru e com adição da cultura starter endógena (“pingo”), responsável pela adição de microrganismos específicos, possui sabor e aspectos sensoriais singulares. O objetivo desse estudo foi avaliar a dinâmica de maturação e sua relação com as mudanças físico-químicas de QMA produzidos em duas fazendas diferentes situadas na região da Serra da Canastra através de métodos dependentes e independentes de cultura ao longo de trinta dias de maturação. Os QMA foram coletados nas cidades de Bambuí (QMA-MCB) e Tapiraí (QMA-MCT), na região da Canastra. A análise multivariada demonstrou a singularidades do queijos, através da sucessão microbiana e características físico-químicas. Fatores abióticos foram responsáveis pela diferença da diversidade microbiana entre as fazendas queijeiras. Diferentes grupos microbianos: os procariotos, *Corynebacterium variabile*, *Lactococcus lactis* e *Staphylococcus saprophyticus*; e os eucariotos *Kluyveromyces lactis* e *Diutina catenulata* dominaram a maturação ao longo do tempo. A comunidade microbiana e a proteólise foram responsáveis pela predominância de grupos voláteis, sendo álcoois predominantes nos QMA-MCB e os ácidos graxos livres/ ácidos e ésteres nos QMA-MCT.

Palavra-chave: Diversidade microbiana; Compostos voláteis; Fisiologia microbiana; Mapas auto-organizáveis; Ácidos graxos; Proteólise.

1 INTRODUÇÃO

Os queijos artesanais são produtos lácteos apreciados por sua importância econômica e valores culturais e sociais, pois sua comercialização gera renda e mantém a tradição da população local (BEMFEITO e colab., 2016). No Brasil, o estado de Minas Gerais é reconhecido como um dos produtores mais tradicionais de queijos artesanais, que é produzido por, aproximadamente, 27 mil produtores, moradores de 519 dos 823 municípios do estado (CORREIA e ASSIS, 2017). Dessa maneira, a fabricação de queijo constitui uma fonte de rendas as famílias dos agricultores (KAMIMURA, Bruna A. e colab., 2019).

O Instituto Mineiro de Agricultura (IMA) reconhece dez regiões tradicionais da produção artesanal de queijos mineiros: Araxá, Serra de Canastra, Cerrado, Serro, Serra do salitre, Triângulo mineiro, Serra da Ibitipoca, Campos das Vertentes, Entre serras da Piedade ao Caraça e Diamantina (EMATER, 2021; IMA, 2017, 2020a; b). O processo de produção desses queijos envolve o uso de leite cru de vacas de rebanho próprio, coalho, sal e cultura endógena (“pingo”), que contribui para a variabilidade do queijo relacionado às características físico-química, sensoriais e microbiológicas de cada região e queijaria (CAMPOS e colab., 2021; MOUNIER e colab., 2008; PERIN e colab., 2017; RESENDE e colab., 2011).

A microrregião da Serra da Canastra foi uma das primeiras regiões reconhecida pelo IMA, em 2004, pela portaria nº 694 (IMA, 2004). As características que diferenciam essa região estão ligadas a fatores abióticos, como pastagens forrageiras e condição climática tropical, com invernos secos e verões chuvosos, de forma que imprimem sabor e aroma (*Terroir*) únicos aos produtos (BORELLI e colab., 2016; EMATER, 2023; KAMIMURA, Bruna A. e colab., 2019; PENNA e colab., 2021).

Diversos autores caracterizaram físico-quimicamente os QMA, afirmando que sua composição pós produzida é de 44,9% de umidade, 0,5% de acidez titulável, 18,5% de proteína, 23,6% de gordura e 1,9% de cloreto (DA SILVA e colab., 2012; NARIMATSU e colab., 2003; OLIVEIRA e colab., 2013). Como o modo de produção desses queijos são tradicionalmente reconhecidas (IPHAN, 2008), o consórcio microbiano define características do *Terroir*, de forma que a identificação dos microrganismos envolvidos no processo de produção e maturação pode contribuir para entender o estabelecimento de indicações geográficas como a denominação de origem protegida (DOP), bem como conhecimentos importantes sobre sua segurança e interferência da tecnologia de produção (SANT’ANNA e colab., 2019a). O gênero *Lactococcus* é predominante no queijo dessa região (KAMIMURA, Bruna Akie e colab., 2019).

A utilização de métodos dependentes de cultivo, necessitam da capacidade de isolar e cultivar e podem não revelar toda a diversidade microbiana de ambientes complexos, pois as técnicas de cultivo *in vivo*, são limitadas quando as células estão danificadas, predominância de grupos microbiano com maior população, baixa especificidade e reprodutibilidade e alta carga de trabalho, além do baixo poder discriminatório. Portanto a identificação polifásica ou combinada é preferencialmente utilizada (PERIN e colab., 2017; TEMMERMAN e colab., 2004). Logo os métodos independentes de cultura foram desenvolvidos para contornar as limitações do cultivo convencional para análise de comunidades microbiana, sendo ela mais rápida para a detecção específica de gênero, espécie ou cepa, pois são mais sensíveis. Estudos anteriores avaliaram a diversidade microbiana de toda a cadeia produtiva de queijos, incluindo ambiente, prateleiras e utensílios utilizando esses métodos (CASTRO e colab., 2016; KAMIMURA, Bruna A. e colab., 2020; KAMIMURA, Bruna Akie e colab., 2019; KOTHE e colab., 2022; MARGALHO e colab., 2020; PERIN e colab., 2017; SANT'ANNA e colab., 2019b), no entanto ainda não foi realizado durante a maturação de queijos produzidos na microrregião da Serra da Canastra.

Diante disso, o objetivo desse trabalho avaliar a dinâmica de maturação por meio de métodos dependentes e independentes de cultivo, bem como relacionar as mudanças físico-químicas de queijos minas artesanais produzidos em duas queijarias diferentes situadas na microrregião da Canastra em Minas gerais, Brasil.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Amostras de Queijo minas artesanais da Canastra

Queijos minas artesanais da microrregião da canastra (QMA-MC) de casca lisa, recém-fabricados, foram coletados em propriedades localizadas em Bambuí (QMA-MCB) (20° 1' 17" S, 45° 57' 39" O, 725 m) (n=21) e Tapiraí (QMA-MCT) (19° 53'16" S, 46° 01' 13" O, 673 metros) (n=21), Minas Gerais, Brasil. Os queijos foram transportados em caixas isotérmicas com gelo reutilizável para o Laboratório de Microbiologia dos alimentos, do Departamento de Ciência dos Alimentos na Universidade Federal de Lavras.

Maturação *ex situ* dos queijos foi realizada em sala de maturação, durante 30 dias, com temperatura variando entre 19 - 21°C, controlada por ar condicionado, e umidade relativa de 70-80%. A amostragem para análises físico-químicas e microbiológicas foram realizadas a cada

5 dias, o qual o queijo foi fracionado e ralado, com auxílio de ralador manual. Os QMA-MC foram dispostos em prateleiras de madeira pinus não tratada (140 mm x 400mm), de forma que as mesmas passaram por revezamento de sua posição na sala, bem como foi realizada a viragem dos queijos diariamente. O tempo desde a coleta da amostra até o início das análises foi de 24 horas.

2.2 Parâmetros físico-químicos

As análises físico-químicas foram realizadas nos tempos 0, 5, 10, 15, 20, 25 e 30 dias de maturação. Umidade, proteína e lipídeos foram determinados e expressos em $g \cdot 100g^{-1}$ (AOAC, 2016). O potencial hidrogeniônico (TEC5, Tecnal, Piracicaba, São Paulo, Brasil), acidez titulável total (ATT), expressa em $g \cdot 100g^{-1}$ de ácido láctico, atividade de água (Decagon Devices Inc., Pullman, WA, EUA), sal na umidade, expressa em % (BARBANO e colab., 1991) e extensão e profundidade de proteólise, baseado no valor de nitrogênio total (TN), pH de 4,6, nitrogênio solúvel em ácido (ASN) e nitrogênio solúvel em ácido tricloroacético (TCA) a 12% (NPN) também foram avaliados (CARNEIRO e colab., 2020).

Os parâmetros colorimétricos foram determinados pelo colorímetro (CR-400, Konica minolta, Tokyo, Japão), cujo resultados foram expressos pelo sistema CIE em valores de L^* , a^* , b^* , Chroma e ângulo Hue* e índice de amarelecimento (IA) (MINOLTA, 1998).

Os queijos minas artesanais foram seccionados em porções de 1 cm^3 . A análise de perfil de textura (TPA) foi determinada mediante o uso de texturômetro (Texture Analyser, TA-XT Plus, Surrey, Inglaterra), utilizando uma probe cilíndrica de aço inoxidável (35mm), realizando uma leitura direta das amostras com dez repetições. Os parâmetros do perfil de textura foram velocidade de pré-teste, teste e pós-teste de 1,0 mm/s e 10 mm/s, respectivamente; taxa de deformação de 50 %. Os indicadores de TPA registrados foram dureza, coesividade, elasticidade, mastigabilidade e resiliência. Os dados foram coletados pelo software Texture Expert for Windows 1.20 (Stable Micro Systems) (JIA e colab., 2021).

2.3 Qualidade higiênico-sanitária

Os QMA-MC foram avaliados quanto à qualidade microbiológica (Brasil, 2022). A presença/ ausência de *Salmonella* spp. foi determinada de acordo com método BAM/ FDA (ANDREWS e colab., 2007). O ensaio de *Listeria monocytogenes* realizou-se de acordo com método BAM/ FDA (HITCHINS e colab., 2007). Também foram realizadas a pesquisa de

Staphylococcus aureus coagulase positivo por método de contagem direta em placa (BENNETT e colab., 2015) e *Escherichia coli*, pelo método do número mais provável (KORNACKI e colab., 2015).

2.4 Contagem total de microrganismos por meio diferencial-seletivo

Neste estudo a amostragem para as análises microbiológicas foi realizada em diferentes tempos (0, 5, 10, 15, 20, 25, 30 dias). Dessa maneira, assepticamente, 10 g de QMA-MC foram homogeneizados em 90 mL de citrato de sódio 2% (m/v), em homogeneizador (490 golpes/min) por 5 minutos. As células vegetativas foram quantificadas por semeadura de 100 µl das diluições seriadas em diferentes meios seletivos para a contagem de distintos grupos microbianos. Para a contagem total de bactérias do ácido lático (BAL) foi utilizado meio seletivo ágar Man, Rogosa e Sharpe (MRS), suplementado com nistatina 0,25% (v/v), das quais as diluições foram semeadas em superfície e as placas incubadas a 32±1 °C por 48 horas em anaerobiose, gerada por geradores de anaerobiose (Anaerobac, Probac do Brasil®, São Paulo, Brasil) (NJONGMETA e colab., 2015).

Para a contagem total de microrganismos aeróbios mesófilos, foi empregado o ágar tripticase de soja (TSA) suplementado com nistatina 0,25% (v/v). As placas semeadas em superfície foram incubadas à 37±2 °C por 24 horas (RYSER e SCHUMAN, 2015). Já para a contagem de leveduras e fungos filamentosos, utilizou-se o ágar YEPG (Extrato de levedura: 10g; Peptona bacteriológica: 20g; Glicose: 20g; Ágar 15g/ 1 litro de água destilada) suplementado com cloranfenicol 0,1% (p/v). Incubou-se as placas semeadas em superfície à 30±2 °C por 72 horas (RYU e WOLF-HALL, 2015). Todas as contagens de microrganismos foram expressas em unidades formadoras de colônia por grama (log UFC.g⁻¹).

2.5 Perfil microbiano

2.5.1 Extração de DNA e amplificação por PCR

Cinco gramas foram utilizados para a extração de DNA total de QMA-MC. A cada tratamento foram adicionados 45 mL de citrato de sódio 2% (m/v) à 45 °C e homogeneizados em Stomacher Metroterm® (260 golpes/min) por 5 minutos. Quinze mililitros do sobrenadante foram transferidos para tubo Falcon e centrifugados à 10000 g/ 10 min/ 25°C. Camadas de gordura foram retiradas com auxílio de swabs estéreis e o sobrenadante foi descartado. Para lavagem e ressuspensão do pellet, foi adicionado 1 mL de citrato de sódio 2% (m/v) e em

seguida centrifugado 10000 g/ 10 min/ 25°C. Esse procedimento foi realizado quatro vezes até que não houvesse mais gordura no tubo. O sedimento celular resultante foi usado para extração de DNA. A extração de DNA foi realizada usando o kit Invitrogen PureLink Microbial DNA Purification seguindo as instruções do fabricante (Invitrogen Canada Inc., Burlington, ON, Canadá), utilizando o protocolo para cultura microbiana e amostras de meios de transporte (BARZIDEH e colab., 2022).

O DNA para procariotos foi amplificado com os primers 338fgc (5'-CGCCCCG CCGCGCGCGGGCGGGCGGGGCGGGGGCACGGGGGGACTCCTACGGGAGGCGCAG-3') (o grampo GC está sublinhado) e 518r (5'-ATT ACC GCG GCT GCT GG-3'), que tem como alvo a região V3 do gene 16S rRNA. Já para a comunidade eucariótica foi amplificado com os primers NS3 (GCAAGTCTGGTGCCAGCAGCC) e YM951r, (TTGGCAAATGCTTTCGC) que tem como alvo um fragmento do gene 18S rRNA. O primer NS3 tem o grampo GC no final 5': CGCCCCGCCGCGCGCGGGCGGGGCGGGGGCACGGGGGG. A PCR foi realizada em um volume final reação de 20 µL, contendo: 12,5 µL de tampão MasterTaq (MasterTaq master mix, Qiagen, Hilden, Alemanha), 0,5 µM de primer, 1 µL de DNA extraído e 5,5 µL de água ultrapura livre de DNA/RNA. Para os primers de eucarioto, foi utilizado um programa onde o DNA molde foi desnaturado por 5 min a 95 °C, seguido por 30 ciclos, depois desnaturado a 92 °C por 1 min e anelado a 55 °C por 1 min, e a extensão do primer foi realizada a 72 °C por 1 minutos, seguido por uma etapa de alongamento de 72 °C por 7 minutos (RAMOS e colab., 2010). Já para os primers de procariotos o DNA foi desnaturado por 3 min a 94 °C, seguido por 34 ciclos, depois desnaturado a 94 °C por 1 min e anelado a 55 °C por 1 min, e a extensão do primer foi realizada a 72 °C por 1 minutos, seguido por uma etapa de alongamento de 72 °C por 10 minutos. Posteriormente, a qualidade do DNA foi verificada com gel de agarose 0,8% e as amostras foram armazenadas a -20 °C.

2.5.2 PCR-DGGE e Identificação de espécies

Os produtos de PCR foram analisados por eletroforese em gel de gradiente desnaturante (DGGE) usando um BioRad DCode Universal Mutation Detection System (BioRad, Richmond, CA, EUA). Os amplicons de PCR convencional, foram separados por DGGE em gel de poliacrilamida à 8% com gradiente de desnaturação de 30 a 60%, para verificar a comunidade de procariotos e eucariotos. As corridas de gel foram realizadas por 4 h/ 200 V/ 60 °C e, em seguida, os géis foram corados com SYBRGreen I (1:10.000 v/v) (Molecular Probes, Eugene, Reino Unido) (DEMIRCI e colab., 2021; RYCHLIK e colab., 2017). A visualização do gel foi realizada em transiluminador.

Após visualizar os géis, as bandas selecionadas foram excisadas e eluidas em 20 μL de água ultrapura à 4 °C durante a noite. Assim, foram reamplificadas com os primers 518r, para eucariotos, e YM951r, para procariotos. Os produtos foram sequenciados e identificados por comparação com sequências homólogas disponíveis no banco de dados Genbank (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>).

2.6 Compostos bioquímicos

2.6.1 Perfil de Espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (FTIR)

Para avaliar as mudanças químicas ocorridas durante a maturação dos QMA-MC foi realizada a análise de Espectroscopia no Infravermelho por transformada de Fourier (FTIR). Para análise, o queijo foi ralado e introduzido no equipamento Spectrometer Varian 600-IR Series, com acessório GladiATR acoplado para medidas por Reflectância Total Atenuada (ATR). As amostras foram escaneadas de 4000 a 400 cm^{-1} com 32 varreduras para cada espectro com uma resolução de 4 cm^{-1} (LORENÇO e colab., 2021).

2.6.2 Perfil de Ácidos graxos

Para avaliação do perfil de ácidos graxos foram realizados os processos de extração à frio de lipídeos do QMA-MC, via Bligh-dyer (BLIGH e DYER, 1959) e ésteres metílicos de ácidos graxos (FAMES) das amostras dos queijos nos dias 0, 10, 15, 20 e 30 dias foram preparados conforme método padrão ISO 15304 (AOCS, 2013).

Os ésteres resultantes da etapa de esterificação foram submetidos à análise de cromatografia em fase gasosa (GC 2010, Shimadzu Corp, Kyoto, Japão) com detector de ionização de chama (FID), utilizando coluna SP 2560 (100m x 0,25mm x 0,20 μm). As condições foram as seguintes: injeção (1 μl) *split* (1/50) à 260 °C, temperatura inicial de 140 °C, por 5 min, elevando a uma taxa de 4 °C min^{-1} para 240 °C, por 30 min. A taxa de fluxo de 1,0 $\text{ml}\cdot\text{min}^{-1}$, com o uso de hélio como gás de arraste. A identificação e quantificação dos ácidos graxos foram feitos por comparação dos tempos de retenção dos ésteres contidos no padrão Supelco 37 de componentes da mistura FAME (CRM47885 - CAS 75-09-2) com as amostras. A composição de ácidos graxos foi expressa como uma porcentagem e realizada em triplicata.

Os ácidos graxos foram classificados quanto ácidos graxos saturados (SFA), ácidos graxos monoinsaturados (MUFA), ácidos graxos poliinsaturados (PUFA). Além disso, foram calculados índice aterogênico (IA), índice trombogênico (IT), ácidos graxos hipocolesterolêmicos desejáveis (DHFA), ácidos graxos saturados

hipercolesterolêmicos (HSFA) e razão de ácidos graxos hipocolesterolêmicos e hipercolesterolêmicos (H_{po}/H_{per}) (PASZCZYK e ŁUCZYŃSKA, 2020).

2.6.3 Ácidos orgânicos e açúcares

As concentrações de ácido cítrico, tartárico, málico, succinico, láctico, acético, propiônico, butírico e isovalérico e lactose foram determinadas. Quinhentas miligramas de queijo e 2,5 mL de água ultrapura foram homogeneizados em tubo falcon e vortexizadas por cinco minutos, e então centrifugadas duas vezes por 10 minutos/ 4 °C/ 11200g e filtrados em membrana de acetato 0,22 µm. Para determinação de ácidos orgânicos o pH do sobrenadante foi ajustado para 2.1 usando ácido perclórico (16 mM). Os extratos resultantes foram armazenados a -18 °C até as análises (ANDRADE e colab., 2019).

Os extratos foram avaliados utilizando sistema de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) (Model LC-10 Ai, Shimadzu Corp. Kyoto, Japão) equipado com dois sistemas de detectores, sendo Ultra Violet detector (UV) e Refractive Index Detector (RI -10A). Uma coluna de troca iônica Shimpack SCR-101H (7.9 mm × 30 cm) foi utilizada e operada a 30 °C para a lactose, onde foi detectada via RI, e 50 °C para ácidos orgânicos, onde foi detectado por meio de absorvância UV (210 nm), usando uma solução de ácido perclórico a 100 nM (pH 2.1) e um fluxo de 0,6 mL/min. Curvas de calibração foram construídas com padrões para identificar e quantificar os compostos químicos. As análises foram realizadas em triplicata e expressas em mg. g⁻¹ de queijo (PUERARI e colab., 2012).

2.6.4 Compostos voláteis por HS-SPME e GC/MS

A extração de compostos voláteis foi realizada por microextração automática em fase sólida (SPME), utilizando 3 g de QMA-MC ralado, adicionado 4-nonanol (125 mg/L), como padrão interno (ANDRADE e colab., 2019). Os vials foram incubados a 60 °C por 10 min, para atingir o equilíbrio da amostras, e então absorvidos pela fibra 50/30 µm DVB/CAR/PDMS por 30 minutos. A fibra foi mantida, no modo splitless, por 3 min no injetor à 250 °C para dessorção dos voláteis.

A análise foi realizada via cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa (GC-MS) (QP2010SE, Shimadzu Corp. Kyoto, Japão). A separação cromatográfica foi realizada em coluna capilar Carbo-Wax 20 M (30 m × 0.25 mm × 0.25 mm), com taxa de fluxo de 1,0 ml.min⁻¹, usando o gás hélio como gás de arraste. O seguinte programa de temperatura foi usado: 3 min a 40°C, aumento de 4°C/min até 120°C, aumento de 6°C/min até 240°C e

então mantido por 12 min a 240°C. Ionização de impacto de elétrons com uma energia de elétrons de 70 eV, uma faixa de varredura de 35 a 500 amu e uma temperatura de fonte de íons de 230°C foram usados. Os espectros de massa detectados foram comparados com o banco de dados banco de dados NIST11, e uma série de alcanos (C10-C40) foi usada para calcular o índice de retenção (RI). A porcentagem relativa dos compostos foi calculada pela normalização da área do pico (JIA e colab., 2021).

2.7 Análises estatísticas

Um delineamento inteiramente casualizado (DIC) em esquema fatorial foi utilizado dos quais os fatores eram: 2 produtores (Bambuí e Tapiraí) x 7 tempos de maturação (0, 5, 10, 15, 20, 25, 30). Os resultados foram expressos em média \pm desvio padrão, o qual foi aplicada análise de variância (ANOVA) para os parâmetros físico-químicos e microbiológicas, seguido de teste Scott-Knott ($p < 0.05$) entre os tempos de maturação e um teste de t-Student, entre os produtores. Considerou-se estatisticamente significativo o valor de $p < 0.05$. Os métodos estatísticos multivariados, mapa auto-organizáveis (SOM) e as correlações de Pearson foram aplicados para comparar os resultados obtidos durante a maturação de 30 dias. Todas as análises estatísticas foram realizadas no software R (4.0.2, pacotes FactoMineR e factoextra).

3 RESULTADO

3.1 Qualidade higiênico-sanitária

A qualidade microbiológica dos diferentes queijos minas artesanais da microrregião da canastra foi avaliada no início e fim da maturação no intuito de atestar a qualidade higiênica (Tabela 1). A contagem de *E. coli* nos queijos produzidos em diferentes fazendas ficaram abaixo do valor estabelecido pela legislação vigente nos dias 0 e 30 de maturação (Brasil., 2022). O mesmo comportamento foi observado para a pesquisa de *Salmonella spp.*

Tabela 1. Qualidade higiênico-sanitária de queijo minas artesanal produzido em diferentes fazendas na microrregião da Canastra.¹

Qualidade microbiológica	Bambuí	Tapiraí	Parâmetros microbiológicos
--------------------------	--------	---------	----------------------------

	(log UFC/g)				(log UFC/g)	
	Tempo				m	M
	0	30	0	30		
<i>Salmonella</i> spp.	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
<i>Staphylococcus</i> coagulase positiva	3,32±0,03a	1,21±0,03 ^b	4,71±0,0 ^a	2,91±0,3 ^b	2,0	3,0
<i>Escherichia coli</i>	2,46±0,01 ^a	<LD	1,18±0,20 ^a	<LD	1,0	2,0
<i>Listeria monocytogenes</i>	3,76±0,12 ^a	3,26±0,12 ^a	3,13±0,04 ^a	2,59±0,10 ^b	2,0	-

¹Médias ± desvio padrão com letras minúsculas diferentes na mesma linha mostram significância pelo teste T com $p < 0,05$. LD significa que está abaixo do limite permitido pela legislação em vigor (m: limite que separa as unidades de amostra de "Qualidade Aceitável" daquelas de "Qualidade Intermediária"; M: limite que separa as unidades de amostra de "Qualidade Intermediária" daquelas de "Qualidade Inaceitável") (Brasil, 2022).

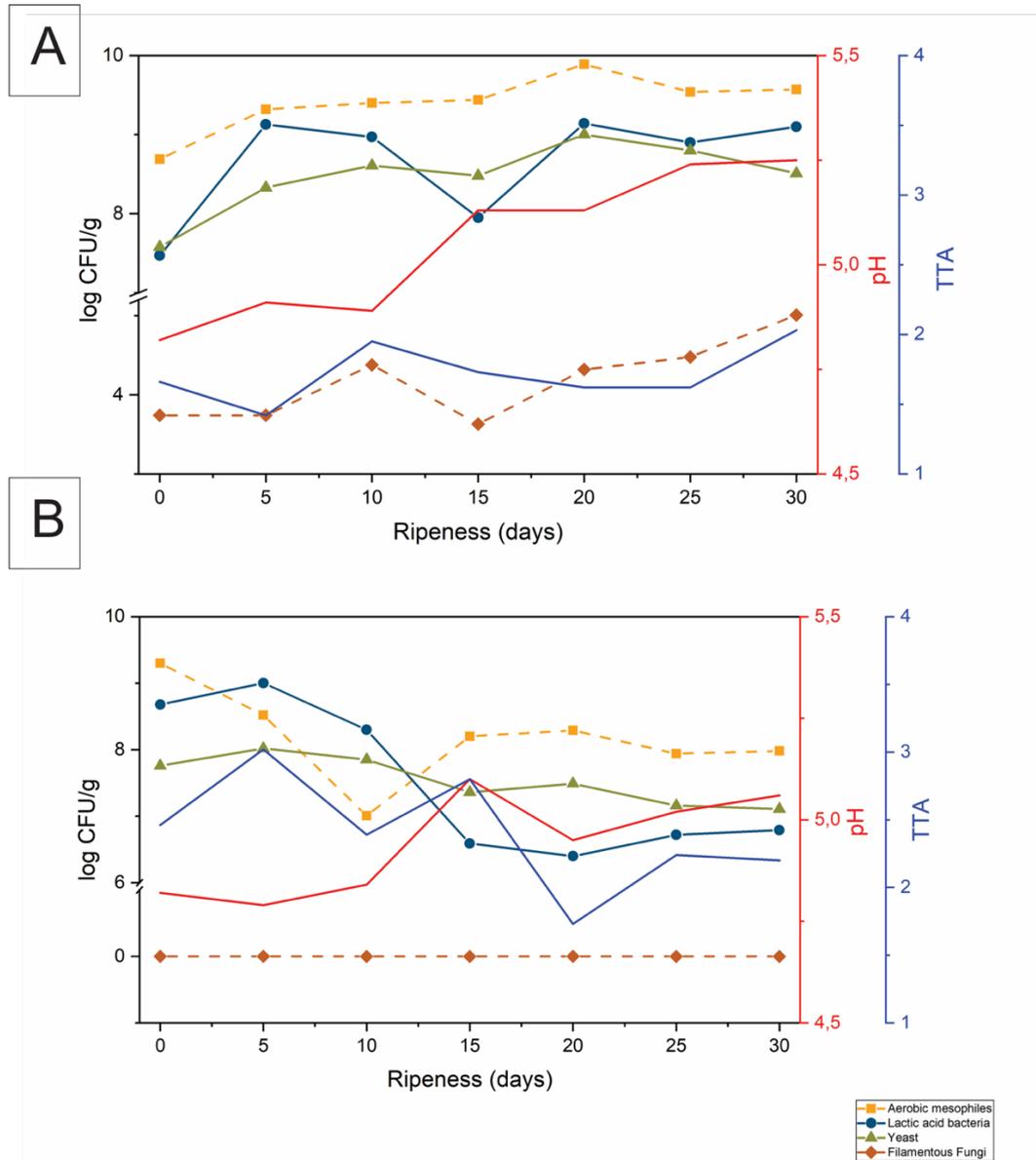
No entanto, houve excesso na contagem microbiológica de *Staphylococcus* coagulase positiva no início da maturação, excedendo os valores estabelecidos pela legislação em cerca de 10 % e 57%, para os queijos produzidos em Bambuí e em Tapiraí, respectivamente. Porém, ao final da maturação atenderam ao limite microbiológicos.

A pesquisa de *L. monocytogenes* demonstrou que os queijos das diferentes queijarias não atenderam a legislação. Observou-se que a contagem microbiológica QMA-MCB não reduziu ao longo do tempo de maturação, do qual ultrapassou o limite permitido em 63%. Ao contrário disso, o queijo de Tapiraí, apesar da redução da contagem microbiana, ao final da maturação o queijo não atendia os parâmetros estabelecidos, ultrapassando o limite em cerca de 29%.

3.2 População de grupos microbianos ao longo da maturação

A contagem de aeróbios mesófilos, bactérias lácticas, leveduras e fungos filamentosos foi realizada (Figura 1). De modo geral, observou-se que a interação dos grupos microbianos foi atípica nos queijos produzidos em diferentes fazendas. Assim, houve diferença estatística entre a população de todos os grupos microbianos investigados, bem como nos valores de pH e ATT que são apresentadas na figura 1.

Figura 1 - Variação da população microbiana (log UFC/g) ao longo de trinta dias de maturação de queijos minas artesanais produzidos em fazendas da microrregião da Canastra. A) QMA-MC fabricado em Bambuí. B) QMA-MC fabricado em Tapiraí.



Fonte: Do autor (2023).

Os QMA-MCB, demonstrou que as BAL, leveduras e os aeróbios mesófilos tiveram um crescimento de 1 log UFC/ g logo nos primeiros cinco dias de maturação. Contudo, apenas os fungos filamentosos, leveduras e aeróbios mesófilos tiveram uma população crescente ao longo da maturação, de forma que as BAL não tiveram uma variação populacional significativa ao longo do tempo. Houve um aumento de pH ao longo do tempo, o qual permitiu o crescimento dos fungos filamentosos após o 10º dia, permitindo se desenvolver na casca do QMA-MC (Figura 1A).

Diante do comportamento dos grupos microbianos avaliados, a premissa do QMA-MCB, não se aplicou aos produzidos em QMA-MCT, demonstrando uma diferença estatística entre as fazendas queijeiras e em todos os grupos microbianos avaliados durante a maturação

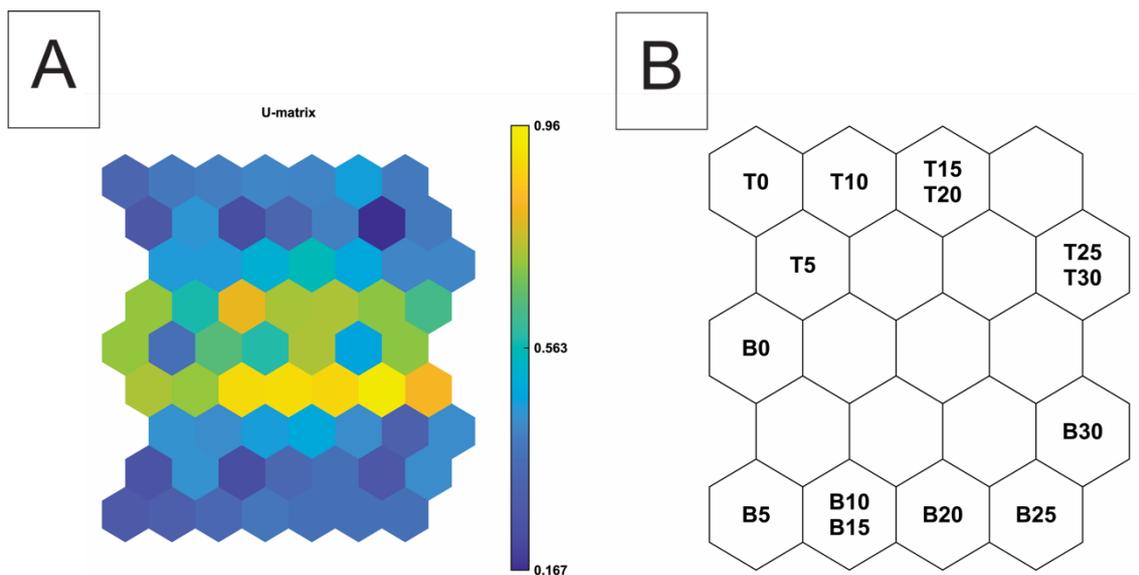
(Figura 1B). Os aeróbios mesófilos, BALs e leveduras iniciaram a maturação com 9,26 Log UFC/g, 8,67 Log UFC/g 7,76 Log UFC/g, respectivamente, decaindo os valores nos primeiros 10 dias e mantendo essa tendência até o 30º dia de maturação, finalizando com uma contagem de 7,98 Log UFC/ g, 6,78 Log UFC/g, 7,10 Log UFC/g, respectivamente.

3.3 Avaliação dos parâmetros físico-químicos, microbiológicos e bioquímicos por SOM

A partir da *U-matrix* (Figura 2A), podemos visualizar a formação de grupos com características semelhantes com base na distância entre os neurônios. A *U-matrix* indica a possibilidade de haver dois grupos separados: um no topo e outro na base da matrix, separados pela faixa amarela no meio. Ao observar esse mapa, o azul em um tom mais escuro demonstra maior proximidade entre as amostras, do contrário pode ser observado quando o tom de amarelo for mais forte.

Figura 2 - Avaliação de variáveis físico-químicas e microbiológicas por rede neural artificial.

A) *U-matrix* dos 40 componentes processados. B) Distribuição dos tempos de maturação dos queijos minas artesanais fabricados em fazendas da microrregião da Canastra nas cidades de Tapiraí (T0, T5, T10, T15, T20, T25, T30) e Bambuí (B0, B5, B10, B15, B20, B25, B30) no SOM.

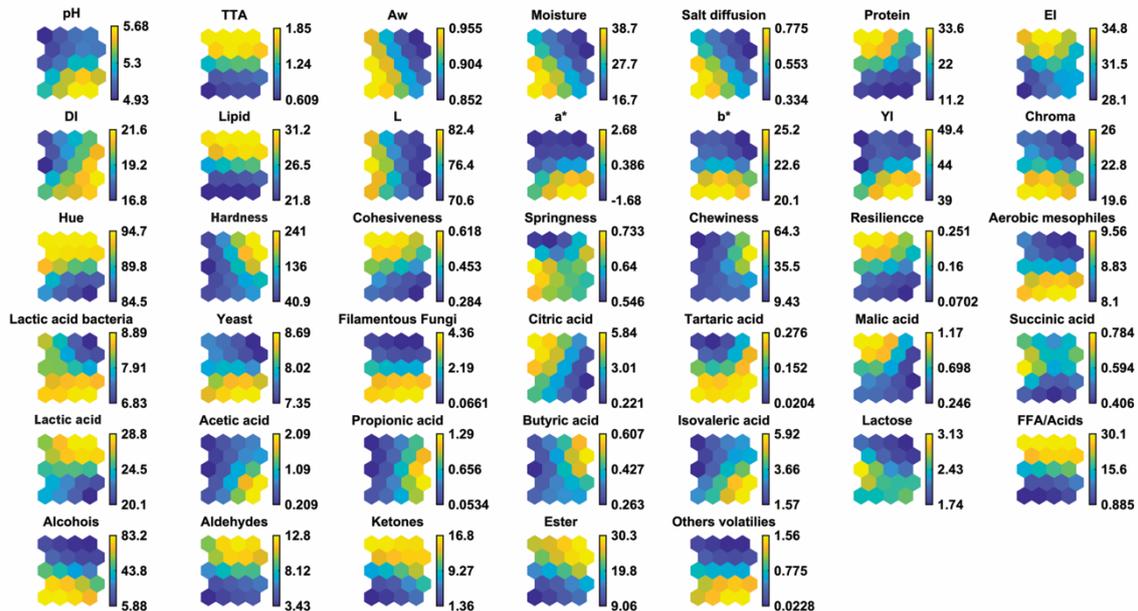


Fonte: Do autor (2023).

Já na figura 2B podemos visualizar como os tratamentos estão distribuídos entre os neurônios da rede. Neste mapa, quando as amostras dividem o mesmo neurônio, é porque elas apresentam alta similaridade, enquanto as amostras completamente diferentes se apresentam distantes no mapa (Figura 3). Comparando as figuras 2A e 2B, podemos perceber que a distância entre as amostras do dia zero das duas cidades, é pequena, indicando que os queijos, mesmo de diferentes produtores, apresentam características similares com base nas análises realizadas. Pequenas diferenças foram notadas entre os tempos intermediários de maturação, pois as amostras estão próximas umas das outras, ao contrário disso, houve diferença entre o tempo inicial e final. Além disso a linha de neurônios amarela esverdeada começando na lateral esquerda na *U-matrix*, indica que há grandes diferenças quando comparamos os locais de produção, principalmente entre os últimos dias de maturação.

A Figura 3 apresenta os planos componentes mostrando as concentrações das variáveis estudadas. A barra de cor ao lado de cada mapa permite visualizar a distância entre os neurônios assim como na *U-matrix*. Comparando a figura 3 com a 2B, podemos inferir que os queijos produzidos em fazendas de Bambuí e Tapiraí foram separados por apresentar valores bem diferentes entre si na maioria das variáveis estudadas. Isto pode ser observado pela variação da escala de cor que ocorre verticalmente.

Figura 3 - Componentes do SOM para 40 variáveis de entrada. Os mapas são combinados como variáveis e são comparados com a distribuição dos grupos representados na Figura 3B. As cores indicam o valor do componente no vetor de peso de cada unidade no mapa, de acordo com as barras coloridas no lado direito.



Fonte: Do autor (2023).

3.3.1 Parâmetros físico-químicos

Os parâmetros físico-químicos podem ser observados na Figura 3. A avaliação foi considerada significativamente diferentes para todos as variáveis avaliadas, bem como entre as fazendas produtoras de queijo ($p < 0,05$). Obteve-se valores de umidade e atividade de água reduzidos ao longo do tempo, de forma a influenciar em parâmetros como a difusibilidade de sal, extensão de proteólise (EI), parâmetros colorimétricos e textura, principalmente.

Diante disso, observou-se a proteólise foi inconsistente entre os queijos ao longo do tempo. Os níveis de proteólise aumentaram significativamente durante o tempo de maturação no QMA-MCB. No entanto, a proteólise só foi significativa a um nível primário desse processo, observada pela extensão da proteólise (EI), variando de 24,23 – 31,10, no início e ao final, respectivamente. Ao contrário disso, foi observado um processo de proteolítico ao longo do tempo a nível de peptídeos curtos e formação de aminoácidos, evidenciado pela profundidade de proteólise (DI) no QMA-MCT.

A análise de variância identificou efeito significativo ($p < 0,05$) do tempo de maturação sobre todos os parâmetros colorimétricos (Figura 3). Logo, observou-se que os queijos ficaram mais escuros, evidenciados pelo parâmetro de luminosidade (L^*), com redução de 25% (91,12 para 69,02), para QMA-MCB e 22% (90,11 para 70,78), para QMA-MCT. Além disso, parâmetros como o hue, demonstraram tons diferentes, de forma que queijo de Bambuí possui um tom marrom amarelado, enquanto o queijo de Tapiraí apresentava um tom marrom acinzentado (Tabela S1)

O perfil de textura demonstrou-se significativo para os todos parâmetros analisados. Destaca-se os parâmetros de dureza, dos quais foi observado o aumento da rigidez ao longo do tempo de maturação, sendo o QMA-MCT (327,09 N) mais duro que o queijo de Bambuí (101,24) ao final de 30 dias de maturação.

3.3.2 Ácidos orgânicos e carboidratos

Os ácidos orgânicos (ácido cítrico, tartárico, málico, succínico, láctico, acético, propiônico, butírico e isovalérico) e lactose detectados podem ser observados na Figura 3. Houve diferença estatística, principalmente entre os tempos zero e o tempo trinta de maturação. Além disso, também foram observadas diferenças na concentração no perfil de ácidos orgânicos

entre os queijos produzidos em diferentes fazendas ($p < 0.05$). Quanto a lactose, observou-se que a no QMA-MCB teve uma redução de 58% ao longo de todo o processo de maturação, enquanto no QMA-MCT não houve variação na sua concentração.

A concentração de ácido cítrico foi reduzindo ao longo do tempo, independente do queijo avaliado (QMA-MCB -T0: 4,70 e T30: 0 mg. g⁻¹; QMA-MCT – T0: 6,38 e T30: 0 mg. g⁻¹). O ácido acético em QMA-MCB aumentou cerca de 42 vezes, do T0 ao T30, enquanto no QMA-MCT não foi observada variação na sua concentração. Com relação ao ácido láctico não foram observadas variações na sua concentração ao longo do tempo. Quanto ao ácido propiônico foi detectado somente após o 10º dia e sua concentração foi aumentando até o final do período analisado de maturação nos queijos produzidos nas duas propriedades (QMA-MCB -T10: 0,18 e T30: 0,99 mg. g⁻¹; QMA-MCT – T10: 0,28 e T30: 0,71 mg. g⁻¹). Aos ácidos orgânicos ligados a alimentação do gado, o ácido butírico, aumentou em cerca de 208% e 192% nos QMA-MCT e QMA-MCB, respectivamente, já o ácido isovalérico foram aumentando ao longo do período de maturação (QMA-MCB - T0: 0 e T30: 6,66 mg. g⁻¹; QMA-MCT – T0: 0,79 e T30: 2,95 mg. g⁻¹).

3.3.3 Ácidos graxos

O perfil de ácidos graxos e índices de saudabilidade dos diferentes queijos ao longo da maturação é apresentado na tabela 2. Houve diferença estatística entre o perfil de ácidos graxos dos queijos de diferentes fazendas avaliadas, bem como na concentração dos compostos. Observou-se que os ácidos graxos saturados (SFA) [C4:0-C:20] eram o grupo mais abundante, seguido dos ácidos graxos monoinsaturados (MUFAS) e os ácidos graxos poliinsaturados (PUFAS). Os SFA com maiores concentrações são o ácido palmítico (C16:0) [QMA-MCT - 36,85 e QMA-MCB - 36,65], ácido mirístico (C14:0) [QMA-MCT - 36,85 e QMA-MCB - 36,65] e o ácido butírico (C4:0) [QMA-MCT – 2,81 e QMA-MCB – 4,75].

Tabela 2. Perfil de ácidos graxos (%) e índices de saúde do queijo minas artesanal produzido em diferentes fazendas na microrregião da Canastra.¹

Ácidos graxos	BambuÍ					TapiraÍ				
	0	10	15	20	30	0	10	15	20	30
C4:0	3,61±0,12 ^{bB}	4,15±0,16 ^{aA}	3,60±0,80 ^{bB}	3,02±0,11 ^{bB}	4,75±0,24 ^{aA}	5,63±0,13 ^{aA}	5,66±0,16 ^{aA}	5,63±0,31 ^{aA}	5,82±0,58 ^{bA}	2,81±0,20 ^{cB}
C6:0	1,76±0,03 ^{aA}	1,80±0,17 ^{aA}	1,69±0,05 ^{bA}	1,65±0,02 ^{bA}	1,62±0,00 ^{bA}	1,53±0,02 ^{aB}	1,67±0,09 ^{aB}	1,53±0,04 ^{aA}	1,58±0,09 ^{aA}	1,56±0,02 ^{aA}
C8:0	1,09±0,02 ^{aA}	1,11±0,10 ^{aA}	1,06±0,01 ^{bA}	1,03±0,00 ^{bA}	1,01±0,00 ^{bA}	0,94±0,00 ^{aA}	1,01±0,06 ^{aB}	0,94±0,04 ^{aB}	0,96±0,04 ^{aB}	0,94±0,01 ^{aB}
C10:0	2,53±0,03 ^{aA}	2,59±0,20 ^{aA}	2,52±0,05 ^{aA}	2,42±0,01 ^{aA}	2,43±0,00 ^{aA}	2,16±0,01 ^{aB}	2,31±0,15 ^{aB}	2,16±0,06 ^{aB}	2,19±0,00 ^{aB}	2,18±0,00 ^{aB}
C11:0	0,34±0,01 ^{aA}	0,35±0,03 ^{aA}	0,34±0,01 ^{aA}	0,33±0,01 ^{aA}	0,32±0,01 ^{aA}	0,30±0,01 ^{aB}	0,32±0,03 ^{aB}	0,30±0,01 ^{aB}	0,31±0,04 ^{aA}	0,30±0,00 ^{aA}
C12:0	3,13±0,05 ^{aA}	3,24±0,27 ^{aA}	3,15±0,08 ^{aA}	3,07±0,01 ^{aA}	3,05±0,02 ^{aA}	2,69±0,01 ^{aB}	2,90±0,21 ^{aB}	2,69±0,03 ^{aB}	2,70±0,04 ^{aB}	2,72±0,01 ^{aB}
C13:0	0,17±0,00 ^{aA}	0,18±0,02 ^{aA}	0,18±0,01 ^{aA}	0,17±0,00 ^{aA}	0,17±0,02 ^{aA}	0,16±0,01 ^{aA}	0,17±0,02 ^{aA}	0,16±0,00 ^{aA}	0,16±0,00 ^{aA}	0,16±0,00 ^{aA}
C14:0	12,21±0,13 ^{aA}	12,70±1,02 ^{aA}	12,00±0,26 ^{aA}	12,19±0,02 ^{aA}	11,83±0,00 ^{aA}	11,13±0,08 ^{aB}	11,76±0,93 ^{aB}	11,13±0,04 ^{aB}	10,84±0,16 ^{aB}	11,03±0,00 ^{aA}
C14:1	1,16±0,01 ^{aA}	1,19±0,10 ^{aA}	1,09±0,02 ^{bA}	1,11±0,00 ^{bA}	1,05±0,03 ^{bA}	1,03±0,01 ^{aB}	1,08±0,08 ^{aB}	1,03±0,01 ^{aA}	1,03±0,01 ^{aB}	1,03±0,01 ^{aA}
C15:0	1,07±0,01 ^{aB}	1,12±0,08 ^{aB}	1,10±0,02 ^{aA}	1,07±0,00 ^{aB}	1,09±0,01 ^{aA}	1,15±0,02 ^{aA}	1,21±0,10 ^{aA}	1,15±0,01 ^{aA}	1,15±0,01 ^{aA}	1,17±0,00 ^{aA}
C16:0	37,02±0,68 ^{aA}	38,46±3,21 ^{aA}	36,83±0,62 ^{aA}	37,02±0,09 ^{aA}	36,65±0,10 ^{aA}	36,91±0,05 ^{aA}	39,01±3,13 ^{aA}	36,91±0,10 ^{aA}	35,90±0,48 ^{aA}	36,85±0,11 ^{aA}
C16:1	2,01±0,02 ^{aA}	2,09±0,15 ^{aA}	1,96±0,04 ^{aA}	1,95±0,05 ^{aA}	1,92±0,05 ^{aA}	1,95±0,01 ^{aA}	2,06±0,18 ^{aA}	1,95±0,00 ^{aA}	1,98±0,05 ^{aA}	1,95±0,00 ^{aA}
C17:0	0,70±0,00 ^{aA}	0,74±0,06 ^{aA}	0,72±0,01 ^{aA}	0,72±0,00 ^{aA}	0,72±0,00 ^{aA}	0,69±0,00 ^{aA}	0,74±0,07 ^{aA}	0,69±0,01 ^{aA}	0,70±0,01 ^{aA}	0,72±0,00 ^{aA}
C18:0	0,24±0,01 ^{aA}	0,25±0,02 ^{aA}	0,24±0,01 ^{aA}	0,24±0,00 ^{aA}	0,23±0,00 ^{aA}	0,20±0,01 ^{bB}	0,23±0,02 ^{aA}	0,22±0,00 ^{aB}	0,23±0,00 ^{aA}	0,23±0,01 ^{aA}
C18:1 trans	9,00±0,16 ^{aB}	9,45±0,84 ^{aB}	9,20±0,17 ^{aA}	9,28±0,02 ^{aB}	9,20±0,03 ^{aB}	9,94±0,02 ^{aA}	10,47±0,84 ^{aA}	9,94±0,02 ^{aA}	9,72±0,09 ^{aA}	10,06±0,06 ^{aA}
C18:1 cis	1,36±0,38 ^{aA}	1,67±0,47 ^{aA}	1,41±0,34 ^{aB}	1,78±0,01 ^{aA}	1,58±0,01 ^{aB}	1,32±0,01 ^{bA}	1,36±0,09 ^{bA}	2,00±0,00 ^{aA}	2,00±0,02 ^{aA}	2,03±0,01 ^{aA}
C18:2 trans	20,48±0,93 ^{aA}	21,96±2,22 ^{aA}	20,75±0,15 ^{aA}	20,92±0,07 ^{aA}	20,29±0,09 ^{aA}	20,17±0,01 ^{aA}	21,26±1,61 ^{aA}	20,17±0,06 ^{aA}	20,76±0,04 ^{aA}	20,76±0,08 ^{aA}
γ-C18:3	0,11±0,93 ^{aB}	0,12±0,01 ^{aB}	0,11±0,00 ^{aB}	0,12±0,00 ^{aA}	0,11±0,00 ^{aB}	0,14±0,02 ^{aA}	0,15±0,12 ^{aA}	0,14±0,00 ^{aA}	0,13±0,00 ^{aA}	0,13±0,00 ^{aB}
α-C18:3	0,13±0,00 ^{aA}	0,14±0,01 ^{aA}	0,12±0,00 ^{bB}	0,13±0,00 ^{aA}	0,12±0,00 ^{bB}	0,10±0,01 ^{bB}	0,13±0,02 ^{aB}	0,12±0,00 ^{aA}	0,13±0,00 ^{aA}	0,13±0,00 ^{aA}
C20:0	1,55±0,01 ^{aA}	1,59±0,14 ^{aA}	1,60±0,02 ^{aA}	1,47±0,00 ^{aA}	1,53±0,01 ^{aA}	1,37±0,00 ^{aB}	1,41±0,01 ^{aB}	1,37±0,01 ^{aB}	1,36±0,01 ^{aB}	1,34±0,00 ^{aB}
C20:3 cis	0,03±0,00 ^{aA}	0,03±0,00 ^{aB}	0,03±0,00 ^{aA}	0,04±0,00 ^{aA}	0,03±0,00 ^{aA}	0,04±0,00 ^{aA}	0,02±0,01 ^{aA}	0,04±0,00 ^{aA}	0,04±0,00 ^{aA}	0,04±0,00 ^{aA}
C20:4	ND	ND	ND	ND	ND	0,07±0,00 ^{aA}	0,04±0,04 ^{bA}	0,07±0,00 ^{aA}	0,07±0,00 ^{aA}	0,07±0,00 ^{aA}
C20:5 cis	0,08±0,00 ^{aA}	0,08±0,01 ^{aA}	0,08±0,00 ^{aA}	0,07±0,00 ^{bA}	0,07±0,00 ^{bA}	ND	ND	ND	ND	ND

C21:0	0,18±0,00 ^{bA}	0,19±0,02 ^{aA}	0,18±0,00 ^{bA}	0,18±0,00 ^{bA}	0,17±0,00 ^{bA}	0,15±0,01 ^{aB}	0,16±0,01 ^{aB}	0,15±0,00 ^{aB}	0,16±0,00 ^{aB}	0,16±0,00 ^{aA}
C22:1	0,05±0,00 ^{aA}	0,05±0,01 ^{aA}	0,05±0,00 ^{aA}	0,05±0,00 ^{aA}	0,05±0,00 ^{aA}	0,04±0,02 ^{aA}	0,04±0,00 ^{aA}	0,04±0,00 ^{aA}	0,05±0,03 ^{aA}	0,03±0,00 ^{aA}
C24:1	ND	ND	ND	ND	ND	0,04±0,00 ^{aA}	0,02±0,03 ^{aA}	0,04±0,00 ^{aA}	0,04±0,03 ^{aA}	0,03±0,00 ^{aA}
SFA	65,60±1,01 ^{aA}	68,47±5,45 ^{aA}	65,20±0,29 ^{aA}	64,57±0,15 ^{aA}	65,57±0,09 ^{aA}	68,07±0,10 ^{aA}	70,87±4,59 ^{aA}	68,07±0,04 ^{aA}	67,08±0,01 ^{aA}	66,06±0,09 ^{aA}
MUFAS	47,46±0,86 ^{aA}	49,39±4,17 ^{aA}	47,39±0,82 ^{aA}	47,68±0,07 ^{aA}	47,17±0,14 ^{aA}	14,34±0,01 ^{aB}	14,81±1,06 ^{aB}	14,34±0,01 ^{aB}	14,82±0,06 ^{aB}	15,33±0,04 ^{aB}
PUFAS	22,37±0,92 ^{aA}	23,92±2,39 ^{aA}	22,69±0,12 ^{aA}	22,74±0,08 ^{aA}	22,15±0,10 ^{aA}	20,44±0,08 ^{aB}	21,29±1,52 ^{aB}	20,44±0,03 ^{aB}	20,98±0,01 ^{aB}	21,56±0,04 ^{aA}
PUFA/SFA	0,34±0,02 ^{aA}	0,35±0,01 ^{aA}	0,35±0,00 ^{aA}	0,35±0,00 ^{aA}	0,34±0,00 ^{aA}	0,30±0,00 ^{bB}	0,30±0,00 ^{bB}	0,30±0,00 ^{bB}	0,31±0,00 ^{bB}	0,33±0,00 ^{aA}
n-6/n-3	11,44±0,58 ^{aB}	11,90±0,28 ^{aB}	11,36± ^{aB}	12,17±0,02 ^{aB}	11,53±0,00 ^{aB}	86,12±11,45 ^{aA}	77,67±1,73 ^{aA}	80,33±0,23 ^{aA}	79,65±1,52 ^{aA}	79,80±1,02 ^{aA}
AI	1,30±0,02 ^{aB}	1,29±0,01 ^{aB}	1,29± ^{aB}	1,29±0,00 ^{aB}	1,28±0,00 ^{aB}	2,41±0,02 ^{aA}	2,43±0,01 ^{aA}	2,28±0,01 ^{bA}	2,31±0,03 ^{bA}	2,29±0,00 ^{bA}
TI	1,42±0,02 ^{aB}	1,40±0,01 ^{aB}	1,40±0,01 ^{aB}	1,40±0,00 ^{aB}	1,40±0,00 ^{aB}	2,68±0,02 ^{bA}	2,68±0,02 ^{bA}	2,53±0,01 ^{aA}	2,56±0,03 ^{aA}	2,54±0,00 ^{aA}
HSFA	52,36±0,85 ^{aA}	54,39±4,50 ^{aA}	51,99±0,95 ^{aA}	52,28±0,08 ^{aA}	51,54±0,14 ^{aA}	50,74±0,07 ^{aA}	53,66±4,27 ^{aA}	49,44±0,12 ^{aA}	50,60±0,68 ^{aA}	51,33±0,11 ^{aA}
DHFA	70,08±0,05 ^{aA}	73,56±6,55 ^{aA}	70,32±0,70 ^{aA}	70,66±0,02 ^{aA}	69,54±0,23 ^{aA}	34,98±0,07 ^{aB}	36,34±2,58 ^{aB}	36,01±0,04 ^{aB}	36,31±0,06 ^{aB}	37,13±0,09 ^{aB}
H _{po} /H _{per}	0,59±0,03 ^{aB}	0,61±0,02 ^{aB}	0,61±0,02 ^{aB}	0,62±0,00 ^{aB}	0,61±0,00 ^{aB}	0,62±0,00 ^{bA}	0,62±0,00 ^{bA}	0,66±0,00 ^{aA}	0,65±0,0 ^{bA}	0,66±0,24 ^{aA}

¹Médias ± padrão com letras minúsculas diferentes na mesma linha mostram diferença estatística pelo teste de Scott-knott com $p < 0,05$, enquanto letras maiúsculas diferentes mostram significância pelo teste T com $p < 0,05$. ND significa que o composto não foi detectado. SFA: ácidos graxos saturados (C4:0-C:20); MUFAS: ácidos graxos monoinsaturados (C14:1, C16:1, C18:1cis, C18:1 trans; C22:1, C24:1); PUFA: ácidos graxos poliinsaturados (C18:2trans, γ -C18:3, α -C18:3); IA: índice aterogênico $(C12:0 + 4 \times C14:0 + C16:0) / [\Sigma \text{ MUFA} + \Sigma \text{ PUFA}(n-6) (n-3)]$; TI: índice trombogênico $(C14:0 + C16:0 + C18:0) / [0,5 \times \Sigma \text{ MUFA} + 0,5 \times \Sigma \text{ PUFA}(n-6) + 3 \times \Sigma \text{ PUFA}(n-3) + (\Sigma n-3) / (\Sigma n-6)]$; DHFA: ácidos graxos hipocolesterolêmicos desejáveis (MUFA + PUFA + C18:0); HSFA: ácidos graxos saturados hipercolesterolêmicos (C12:0 + C14:0 + C16:0); H_{po}/H_{per}: proporção de ácidos graxos hipocolesterolêmicos e hipercolesterolêmicos $[(C18:1 + C18:2(n-6) + C18:3(n-3)) / (C12:0 + C14:0 + C16:0)]$

Um isômero de ácido oleico (C18:1 trans) encontrado em todas as amostras de queijo examinadas corresponde ao ácido predominante do grupo MUFA, cujas concentrações foram 9,20 e 10,06, para QMA-MCB e QMA-MCT, respectivamente. Em relação ao grupo de PUFA, o *trans* - ácido linolênico (C18:2 trans) foi o mais abundante em concentrações de 20,29 e 20,76, para QMA-MCB e QMA-MCT, respectivamente.

Diante dos grupos e concentrações de ácidos graxos importantes para a composição do queijo, correlações a saúde e a doenças crônicas não transmissíveis puderam ser exploradas. Os resultados do presente estudo indicaram que os queijos produzidos em distintos locais são diferentes estatisticamente. Partindo do princípio de que o menores valores dos índices de saudabilidade indicam uma maior quantidade de ácidos graxos anti-aterogênicos (TURAN e colab., 2007), os QMA-MCB, com os níveis de DHFA (69,54), AI (1,28), TI (1,40) e relação PUFA/SFA (0,34) demonstraram possuir maior capacidade anti-aterogênica quando comparado aos QMA-MCT, que possuem os índices de DHFA (37,13), AI (2,29), TI (2,54) e relação PUFA/SFA (0,33).

A relação n-6/n-3 demonstrou-se significativamente diferentes nos queijos avaliados, indicando que a concentração de ácido graxos n-6 é maior em queijos produzidos em Bambuí. Além dessa relação, podemos destacar também Hpo/Hper, que diferiram significativamente entre os queijos, apresentando valores de 0,61 e 0,66, para os QMA-MCB e QMA-MCT, respectivamente.

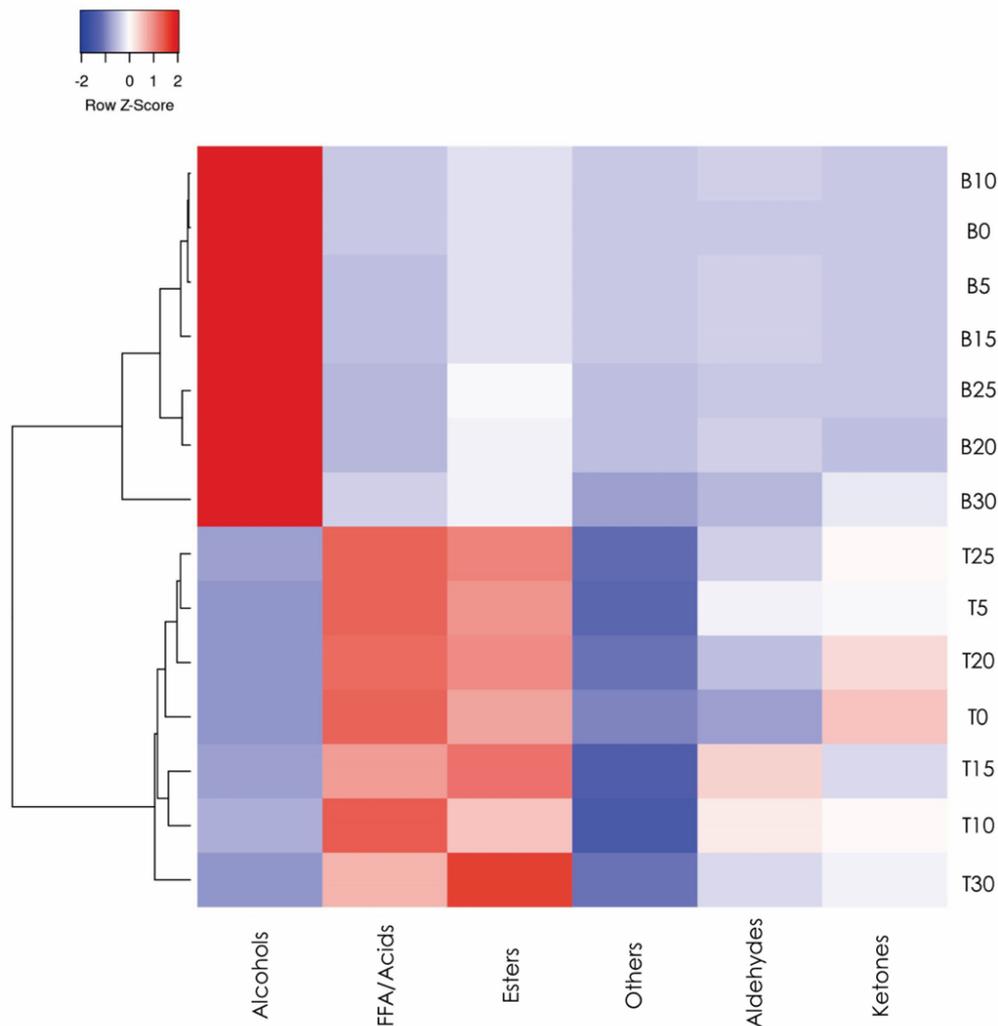
3.3.4 Compostos voláteis por HS-SPME e GC/MS

Os grupos voláteis observados foram, álcoois, ácidos graxos livres (FFA/ácidos), aldeídos, cetonas, ésteres e outros voláteis menos abundantes, como furanonas, alcanos, piranos e fenóis. Foi observado uma diferença no perfil volátil dos QMA-MC, de forma que foram detectados 90 compostos voláteis por HS-SPME/GC/MS (Figura 3, Figura 4 e Tabela S2). Dentre esses compostos, 54 foram detectados no QMA-MCB e 36 QMA-MCT.

Os álcoois foram a principal classe química encontrada nos QMA-MCB ao longo de todo o período de maturação. *Phenylethyl Alcohol* e *3-methyl-1-Butanol* foram os compostos mais abundantes no final de trinta dias, 48,38 e 3,12 %, respectivamente. Além dessa classe, foram detectados grupos ésteres, que estavam presentes no tempo zero, porém foram mais abundantes a partir do tempo 15, de forma que o *Octanoic acid, ethyl ester*, foram os compostos com maior abundância, variando de 1,84 -6,26%. Comportamento parecido ocorreu com os

ácidos graxos livres (FFA/ácidos), do qual o composto *Isobutyric anhydride* (7,65 %) apareceu apenas no final dos trinta dias de maturação.

Figura 4 - Mapa de calor de grupos de compostos voláteis e agrupamento de tempos de maturação (0, 5, 10, 15, 20, 25, 30 dias) de queijos minas artesanais produzidos na microrregião da Canastra (Tabela S2).



Fonte: Do autor (2023).

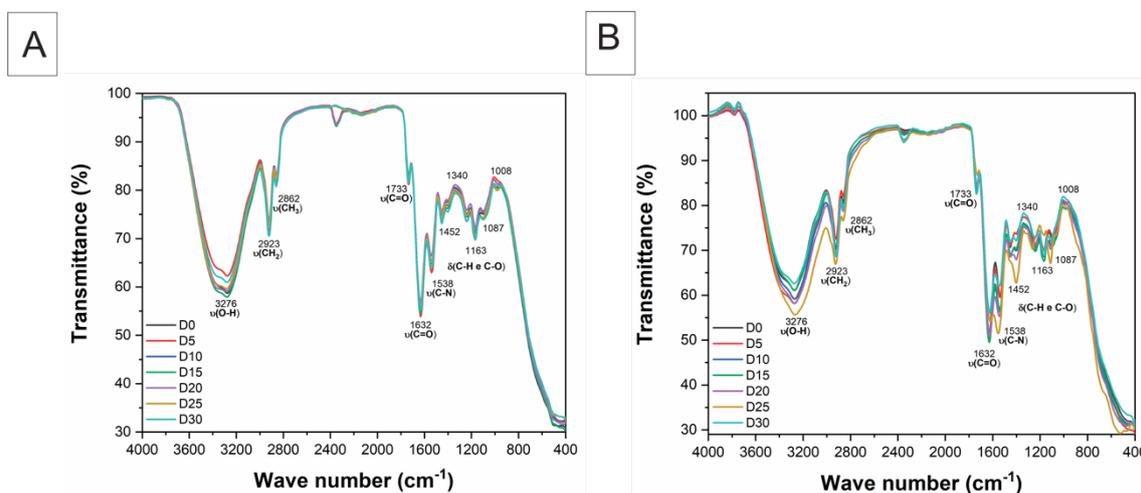
Diferentes grupos químicos foram predominantes no QMA-MCT. Os grupos químicos dominantes FFA/ácidos, os ésteres, estavam presentes em todo o processo de maturação, sendo os grupos mais abundantes neste queijo (Figura 4). Compostos como *Isobutyric anhydride* e *Hexanoic acid, 2-methylbutyl ester* (23,05, 7,20%, respectivamente), apesar de suas presenças serem maiores nos primeiros dias da maturação, foram os compostos mais abundantes. Cetonas tinham uma maior frequência no início do processo, com compostos como *2-Pentadecanone* e

4-Heptadecanone (7,26 e 5,29 %, respectivamente), porém foram menos presentes até o final do processo de maturação. Mesmo comportamento foi observado pelos aldeídos (Figura 3).

3.4 Perfil do infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)

Os dados obtidos através do FTIR foram utilizados como ferramenta confirmativa para a predição das propriedades físico-químicas dos queijos (Figura 5). Os espectros obtidos para os queijos foram processados e os picos foram identificados. Tanto para os espectros para os QMA-MCB (Figura 5A) quanto para QMA-MCT (Figura 5B), o pico com transmitância mínima em 3276 cm^{-1} é relativo as ligações hidroxilas e está fortemente correlacionado com os teores de umidade, e as análises físico-químicas de textura (FAGAN e colab., 2007a; SUBRAMANIAN e colab., 2011a).

Figura 5 - Espectros FTIR-ATR de queijos minas artesanais produzidos em diferentes cidades da microrregião da Canastra. A) QMA-MC produzido em Bambuí. B) QMA-MC produzido em Tapiraí.



Fonte: Do autor (2023).

Os picos de transmitância em 2923, 2862 e 1733 cm^{-1} estão associadas as vibrações de ligações CH_2 , CH_3 e C=O presentes em compostos lipídicos. Já os picos nas regiões de 1632 e 1538 cm^{-1} são associadas as amidas I e II, respectivamente (LORENÇO e colab., 2021). Também foi possível observar variação em outros picos nas regiões de baixo comprimento de onda, 1452, 1340, 1235, 1163, 1087, 1008 cm^{-1} referentes a dobramento de ligações químicas de ácidos, ésteres e cadeias alifáticas de ácidos graxos e carboidratos (DE JESUS e colab.,

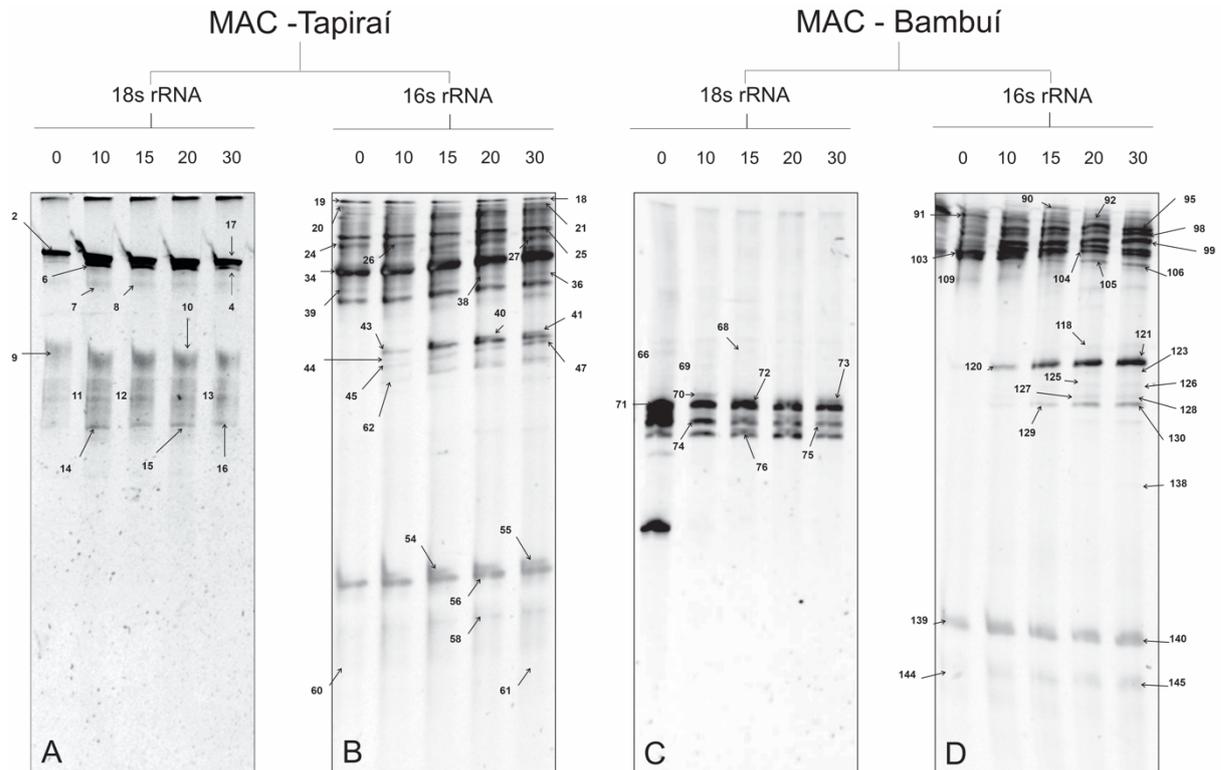
2020a; FAGAN e colab., 2007b; SUBRAMANIAN e colab., 2011b). A maioria dos picos identificado na microrregião do infravermelho médio durante a maturação do queijo são identificados e atribuídos a grupos funcionais como CH₂/CH₃, C-O e C=O relacionados a triacilglicerídeos e ésteres (CEVOLI e colab., 2013).

3.5 Impressão digital e sequenciamento PCR-DGGE

O DNA total dos queijos produzidos em diferentes localidades foi utilizado como molde nas reações de PCR para os dias 0, 10, 15, 20 e 30 da maturação. A figura 4B e 4D mostra o perfil de DGGE das bandas amplificadas dos genes 16s rRNA da comunidade bacteriana presente durante a maturação. Cada fazenda produtora de queijos minas artesanal apresentou impressões digitais diferentes. Apesar disso, alguns microrganismos estavam presentes nas duas propriedades avaliadas.

No QMA-MCT (Figura 4B) foram identificadas as seguintes bactérias: *Lactococcus lactis subsp. lactis* (Bandas: 24, 25, 26, 34, 36, 38, 39, 54, 55, 56, 60, 61; 98,79%, EU337111.1), *Lactococcus garvieae* (Bandas:18, 19; 96,34%; MH295803.1), e as bandas 20, 21 foram atribuídas ao gênero *Lactococcus* sp., estiveram presente em toda o processo de maturação do queijo. Já a espécie *Corynebacterium variable* (Bandas: 40, 41, 43, 44; 100%, M1573863.1) foi identificada somente a partir do 10º dia, bem como a banda 62 que foi semelhante ao gênero *Corynebacterium* sp. Diferentemente, a *Lentilactobacillus hilgardii* (Bandas: 47; 96,36%; CP050262.1) e *Streptococcus ferus* (Bandas: 27, 94,55%, NR115276.1), foram identificadas apenas no último dia da maturação. Para os QMA-MCB, foram identificadas as bactérias: *Staphylococcus saprophyticus* (Bandas: 90, 92, 95, 98, 99, 104, 139, 140; 100%, CP054831.1-OQ603042.1) estava presente em todo processo de maturação, *Corynebacterium variable* (Bandas: 120, 121, 123, 126, 129, 130; 100%; MT573863.1) acompanhou a tendência do QMA-MCT, *Lactococcus lactis* (Bandas: 109; 99,34%; OP714092.1) foi identificada apenas no T0, T10 e T15, a *Lactococcus curvatus* (Bandas: 103, 105; 98,71%; OQ569417.1- DQ336384.1), que apareceu também apareceu em todo o processo de maturação. Já as bandas 118 (Uncultured *Rhodanobacter* sp.) e as 127, 128 (uncultured *Proteobacterium* sp.) foram identificadas no T20 e T30 e a 125 (uncultured *Streptomyces*), apenas no T20, e as bandas 106 (uncultured *Trichococcus* sp.) e 138 (*Paenibacillus* sp.) foi identificada apenas no final da maturação.

Figura 6 - Perfil de DGGE microbiano. A) Perfil de DGGE do fragmento do gene 18s rRNA da região da canastra produzido em uma fazenda em Tapiraí. (B) Perfil de DGGE da região V3 - 16s rRNA da região da canastra produzida em uma fazenda em Tapiraí. (C) Perfil de DGGE do fragmento do gene 18s rRNA da região da canastra produzido em uma fazenda em Bambuí. (D) Perfil de DGGE da região V3 - 16s rRNA da região da canastra produzida em uma fazenda em Bambuí.



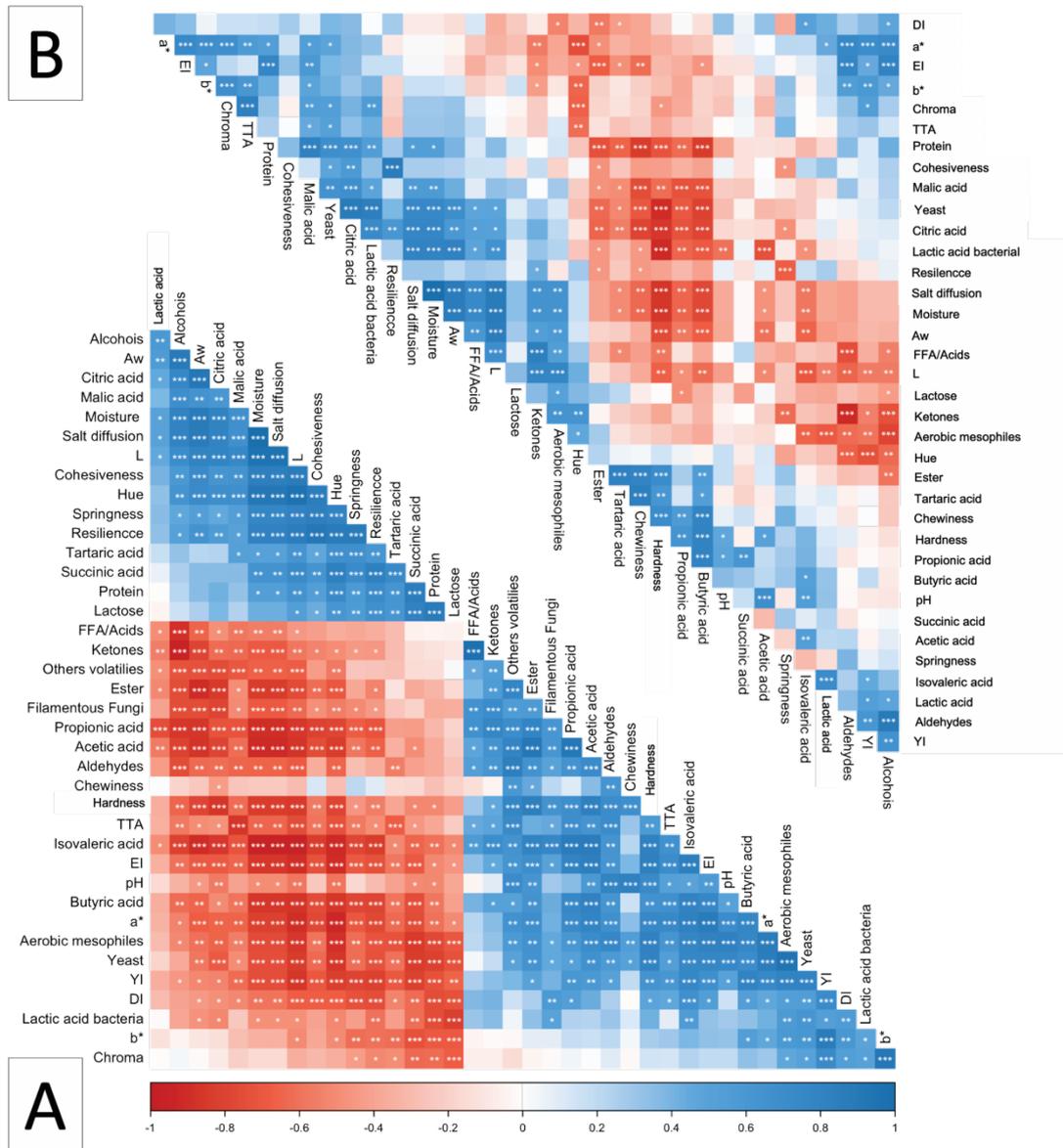
Fonte: Do autor (2023).

A identificação de microrganismos eucarióticos foi realizada e o perfil de DGGE das bandas amplificadas dos genes 18s rRNA da comunidade eucariótica presente durante a maturação pode ser observado na figura 4A e 4C. Nos QMA-MCT foram identificados apenas dois microrganismos: *Kluyveromyces lactis* (Bandas: 2, 6, 7, 8, 10; 99,73%; CP042458.4) que estava presente em todo os processo de maturação e a banda 12 semelhante ao gênero *Candida* sp. (87%; MH545927.1) foi identificada apenas no dia 15 da maturação. A *Kluyveromyces lactis* (Bandas: 70, 71, 72; 98,61%; CP042458.1) também foi identificada nos QMA-MCB, também estava presente ao longo dos trinta dias de maturação, bem como *Diutina catenulata* (Bandas: 66, 68, 69, 74, 75, 76; 98,95%; MK394156.1). A banda 73 foi considerada semelhante ao gênero *Meyerozyma* sp. (83,56%; KM222231.1) e foi identificada apenas no 30º dia de maturação.

3.6 Correlação entre os grupos microbianos, parâmetros físico-químicos e compostos bioquímicos

O teste de correlação de Pearson foi realizado para averiguar a interação entre os parâmetros físico-químicos, microbiológicos e os compostos bioquímicos (Figura 6). De maneira geral, houve uma relação entre os parâmetros avaliados, indicando que os queijos minas artesanais, por serem uma matriz complexa, queijos produzidos em diferentes fazendas possuem características singulares, apesar de serem da mesma região. A Correlação dos QMA-MCB pode ser observada na figura 6A. Verificou-se uma forte correlação entre leveduras e os aeróbios mesófilos (0,95). Além disso, uma correlação positiva moderada entre as bactérias lácticas, no valor de 0,5 ($p < 0,05$), 0,58 ($p < 0,01$) e 0,61 ($p < 0,01$), com fungos filamentosos, aeróbios mesófilos e leveduras, respectivamente, podem ser observada. Relações físico-químicas foram identificadas, principalmente pela presença de leveduras e aeróbios mesófilos, dos quais observou-se correlações com a luminosidade, saturação, YI, EI, DI, dureza, presença de ácido acético e alguns grupos voláteis, como ésteres e outros voláteis. Além disso, os fungos filamentosos demonstraram correlações de moderada a forte para os compostos voláteis. Como esperado, a dureza está ligada a presença de leveduras, aeróbios mesófilos e ao processo de proteólise.

Figura 7 - Correlações de Pearson das variáveis físico-químicas e microbiológicas dos tempos de maturação (0, 5, 10, 15, 20, 25, 30 dias). A) queijo minas artesanal fabricado na microrregião da Canastra. A) QMA-MC fabricado em Bambuí. B) QMA-MC fabricado em Tapiraí. (*) A correlação é significativa em um nível de 0,05; (**) A correlação é significativa em um nível de 0,01; (***) A correlação é significativa em um nível de 0,001.



Fonte: Do autor (2023).

Muitas outras relações foram observadas nos QMA-MCT (Figura 6B). Observou-se correlações entre a EI, DI e as leveduras com valores de 0,70 ($p < 0,001$) e 0,55 ($p < 0,01$), indicando que esse grupo microbiano auxiliou no processo de proteólise. Comportamento diferente ocorreu no QMA-MCB, onde os todos os grupos microbianos investigados auxiliaram nesse processo. Além disso, esse processo EI ajudou na formação de álcoois (0,89) e aldeídos (0,77), em uma forte correlação positiva. Diferentemente das correlações do queijo produzido em Bambuí, houve fraca correlação positiva significativas das BAL (0,21) e leveduras (0,13) com aeróbios mesófilos. Contudo, uma forte correlação entre leveduras e BAL (0,84) foi observada. Quanto aos compostos bioquímicos, observou-se uma forte correlação negativa com

os ésteres e as leveduras (-0,64) e uma positiva com o ácido cítrico (0,89), málico (0,66). Forte correlação positiva das cetonas com os aeróbios mesófilos (0,63) foi observada. Quanto as bactérias lácticas, a correlação demonstrou que ela não estava ligada a formação de compostos voláteis, mas sim com os ácidos orgânicos, como o ácido cítrico (0,74), bem como parâmetros físico-químicos, como luminosidade (0,65), Aw (0,82), umidade (0,80) e difusão de sal (0,80), principalmente.

4 DISCUSSÃO

O estudo realizado nos queijos produzidos na microrregião da Canastra nos dois produtores selecionados é importante para entender a regionalidade e individualidade de cada queijaria, principalmente, para trilhar caminhos na melhora da qualidade, através das características microbiológica e físico-químicas. Os QMA-MC na pesquisa de *E. coli* e *Salmonella* sp. estavam dentro do limite permitido pela legislação. No entanto, a pesquisa de *Staphylococcus* coagulase positiva e *Listeria monocytogenes* não atenderam a legislação. Diante disso, para que os queijos atendam a legislação brasileira, o produto derivado do leite, deve atender toda a normativa. Dessa maneira as contagens microbiológicas dos queijos avaliados encontram-se fora dos limites de qualidade estabelecidos pela instrução normativa nº 161 de 2022 (Brasil, 2022). Microrganismos indesejáveis foram identificados no processo de maturação, como *Staphylococcus saprophyticus* (espécie dominante na maturação de QMA-MCB), e *uncultured Proteobacterium* sp., *uncultured Trichococcus* sp., *Paenibacillus* sp.. Estes esse microrganismos, geralmente, estão ligados ao leite cru e outras fontes agrícolas, como silagem e concentrado de ração para vacas, pastagens, solo, fezes, úberes sujos, cama e equipamentos de ordenha contaminados (GLEESON e colab., 2013).

Muitos trabalhos relataram um aumento da contagem microbiológica de *Staphylococcus* sp e *Listeria monocytogenes* em queijo após a sua a produção, devido à retenção física de microrganismos na coalhada e em parte ao crescimento microbiano durante a coagulação (CAMPOS e colab., 2021; DIEZHANDINO e colab., 2015; KAMIMURA, Bruna A. e colab., 2019). Medidas de controle podem ser adotadas para garantir a qualidades desses produtos. Atentando-se a todas as etapas do processo de produção do queijo, desde a ordenha até o produto. Logo, o monitoramento da saúde dos animais, sempre se atentando a animais acometidos com mastites, desinfecção da pele do animal, higiene dos manipuladores e equipamentos são necessários, juntamente com o apoio de agências governamentais, para

orientação e implementação de boas práticas de fabricação (BPF) (CAMPOS e colab., 2021; KOUSTA e colab., 2010).

O queijo possui uma composição físico-química heterogênea que oferece a possibilidade de colonização simultânea de vários grupos microbianos, que utilizam diversificadas fontes de carbono. De maneira geral, os queijos produzidos em diferentes fazendas queijeiras, demonstraram ter características singulares. No entanto, fatores intrínsecos, como a redução da umidade e atividade de água, bem como o pH e a variação da acidez influenciaram a distribuição espacial dos microrganismos, pois são alterações físico-químicas que controlam o crescimento microbiano, fato esse que influenciou na inexistência de fungos filamentosos no QMA-MCT (BERESFORD e colab., 2001; CASTRO e colab., 2016; MAYO e colab., 2021).

O pH de queijos recém-fabricados é considerado ácido, devido a concentração de ácidos orgânicos, produzidos por bactérias lácticas iniciadoras (SLAB), como *Lentilactobacillus hilgardii*, presentes na cultura endógena, fornecem fontes de carboidratos, através do ácido cítrico, galactose e produtos da lise celular (BUDINICH e colab., 2011). Assim, permitem que as bactérias lácticas não iniciadoras (NSLAB) e leveduras, como *Lactococcus garvieae*, *Streptococcus ferus*, *Kluyveromyces lactis*, *Lactococcus curvatus* identificadas neste trabalho, cresçam rapidamente, caracterizando um comportamento de mutualismo, logo no início do processo de maturação (T0-T5). Assim, pode se observar o aumento da população de BALs, aeróbios mesófilos e leveduras (Figura 1) com o aumento da concentração de ácido isovalérico, butírico para QMA-MCB, e ácido málico para QMA-MCT, sendo a concentração de ácido acético comum aos queijos.

A partir do dia dez, foi observada desacidificação dos queijos, provavelmente pelo consumo do ácido cítrico. O aumento da população de aeróbios mesófilos, leveduras e fungos filamentosos (apenas no QMA-MCB) foram responsáveis pela produção de vários ácidos (correlação positiva – Figura 6), como a ácido propiônico, acético e isovalérico. Esse processo, ocorre principalmente na casca/superfície do queijo permitindo a presença de comunidades microbianas menos tolerantes a ácidos, como a *Corynebacterium variable* e *Meyerozyma* sp. (apenas em QMA-MCB), que só foram identificadas após o 10º dia de maturação (MAYO e colab., 2021; RADEMAKER e colab., 2005), e *Diutina catenulata* (apenas em QMA-MCB) dominante nos 30 dias de maturação (KOTHE e colab., 2022).

A presença das SLAB e NSLAB, ainda nesse período de maturação, inferem tecnologia no produto, por que são capazes de liberar enzimas proteolíticas que auxiliaram no processo de desenvolvimento do sabor e na regulação da maturação, mas não continuam agindo no queijo

ao longo do tempo (IRLINGER e MOUNIER, 2009; REALE e colab., 2022). O processo de proteólise é dividido, em extensão/ primária (proteínas são hidrolisadas em peptídeos) e profundidade/ secundária (peptídeos são hidrolisados em aminoácidos livres e peptídeos menores), onde as leveduras, os fungos filamentosos e aeróbios mesófilos auxiliam nesse processo apenas nos QMA-MCB (FOX e colab., 2017). Igualmente, o perfil de FTIR (Figura 5) evidencia esse processo, em que os picos amidas I e II, demonstram a mudança associada a caseína e a concentrações de aminoácidos de cadeias laterais (DE JESUS e colab., 2020b; FAGAN e colab., 2007b).

Além disso, a proteólise influencia diretamente no sabor, onde os grupos ester e FFA/ácido, foram os mais evidentes no QMA-MCT. Os álcoois voláteis tiveram uma forte correlação com processo proteolítico primário ocorrido com o auxílio das leveduras em QMA-MCB. Dessa maneira, as transformações bioquímicas estão associadas a queijos frescos, impuros, florais, de tirarem o fôlego, alcoólicos e frutado, minimizando a acidez dos ácidos graxos e o amargor de alguns compostos (BALTHAZAR e colab., 2021; KILCAWLEY, 2017).

Diferentemente disso, foi observado nos QMA-MCB que fungos filamentosos estavam mais relacionados a esses compostos do que as bactérias e leveduras, principalmente por que possuem a capacidade de imprimir transformações no catabolismo dos lipídeos e proteínas por atividade enzimática, que produz compostos orgânicos voláteis (DE SOUZA e colab., 2021; PRACHAROVA e colab., 2018). Com a presença desses grupos, o sabor destes queijos está associado a queijos frutados (KILCAWLEY, 2017).

Metabolismo da lactose residual, do lactato, citrato, lipólise e proteólise são os principais eventos bioquímicos que ocorrem durante a maturação do queijo (XIA e colab., 2022). Além de influenciar no pH, também influencia na textura e fluidez, ao qual modificou-se ao longo do tempo de maturação, de forma que o QMA-MCB foram considerados de estrutura fracas e quebradiças e QMA-MCT, se apresentaram com alta dureza, quebradiço e de difícil mastigação, evidenciado, pelos parâmetros de dureza, elasticidade, coesividade e mastigabilidade (RADOCAJ e colab., 2011; SHAFIUR RAHMAN e AL-MAHROUQI, 2009).

No dia 15 de maturação e até o seu final, comportamentos diferentes na população dos queijos foi observada, principalmente na população de bactérias lácticas e dos aeróbios mesófilos. Comportamento explicado pelo gradativo esgotamento de fonte de carbono, evidenciado pela concentração de lactose, além dos parâmetros como a umidade, A_w e a difusão de sal (Tabela S1). O crescimento desses grupos de microrganismos corrobora com estudo realizados sobre ecologia microbiana em queijos (BERESFORD e colab., 2001; BORELLI e colab., 2016; GOBBETTI e colab., 2018; GONTIJO e colab., 2020; IRLINGER e MOUNIER,

2009; KAMIMURA, Bruna A. e colab., 2019). Apesar das diferenças do comportamento dos grupos de microrganismos avaliados, os QMA-MC apresentam uma microbiota estável de forma que essa variação entre as fazendas queijeiras refletem as práticas e ingredientes empregados pelos produtores de queijo (KAMIMURA, Bruna A. e colab., 2019; RESENDE e colab., 2011).

5 CONCLUSÃO

O conhecimento dos microrganismos e a sua dinâmica ao longo do tempo é de fundamental importância para que a produção de queijos seja melhorada em aspectos de qualidade e segurança alimentar. Dessa maneira esse trabalho forneceu panoramas sobre a similaridade e singularidade sobre os aspectos avaliados, principalmente em relação ao comportamento dos grupos microbianos e suas interações físico-químicas e a presença de diferentes microrganismos dominantes, fato evidenciado pelas redes neurais artificiais e pela PCR-DGGE, respectivamente. As predominantes de procariotos, como *Corynebacterium variabile*, *Lactococcus lactis* e *Staphylococcus saprophyticus* dos eucariotos *Kluyveromyces lactis* e *Diutina catenulata* durante a maturação dos QMA-MC, foi evidenciada, bem como a predominância de álcoois, sendo predominantes nos QMA-MCB e os FFA/ ácidos e ésteres nos QMA-MCB. Finalmente, o estudo faz várias contribuições notáveis para a literatura sobre as interações das comunidades microbianas de QMA-MC durante a maturação.

AGRADECIMENTOS

Os autores gostariam de agradecer à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG: CBB - APQ-04472-17), ao Instituto Agropecuário Mineiro (IMA), ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico, Tecnológico (CNPq) e Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES: Código Financeiro 001) pelo fornecimento dos equipamentos e apoio financeiro, e aos produtores de queijo minas artesanal da microrregião da canastra.

REFERÊNCIAS

ANDRADE, Rafaela Pereira e colab. **Survival of *Kluyveromyces lactis* and *Torulaspora delbrueckii* to simulated gastrointestinal conditions and their use as single and mixed**

inoculum for cheese production. Food Research International, v. 125, p. 108620, Nov 2019. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0963996919304983>>.

ANDREWS, W.H. e colab. Salmonella. Bacteriological Analytical Manual (BAM). 8. ed. [S.l.]: Food and drug administration, 2007. p. 35.

AOAC. **Association of Official Analytical Chemists.** 20. ed. Gaithersburg, Md: AOAC International., 2016.

AOCS. **Official methods and recommended practices of the American Oil Chemists' Society.** Disponível em: <<https://www.aocs.org/info/6th-edition/6th-edition>>. Acesso em: 17 maio 2019.

BALTHAZAR, Celso F. e colab. **Effect of probiotic Minas Frescal cheese on the volatile compound and metabolic profiles assessed by nuclear magnetic resonance spectroscopy and chemometric tools.** Journal of Dairy Science, v. 104, n. 5, p. 5133–5140, Maio 2021.

BARBANO, David M e LYNCH, Joanna M e FLEMING, J Richard. **Direct and Indirect Determination of True Protein Content of Milk by Kjeldahl Analysis: Collaborative Study.** Journal of AOAC INTERNATIONAL, v. 74, n. 2, p. 281–288, 1 Mar 1991.

BARZIDEH, Zoha e colab. **Dynamics of Starter and Non-Starter Lactic Acid Bacteria Populations in Long-Ripened Cheddar Cheese Using Propidium Monoazide (PMA) Treatment.** Microorganisms, v. 10, n. 8, p. 1669, 19 Ago 2022.

BEMFEITO, Raquel M. e colab. **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, Out 2016.

BENNETT, Reginald W. e HAIT, Jennifer M. e TALLENT, Sandra M. **Staphylococcus aureus and Staphylococcal Enterotoxins.** Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods. 8. ed. [S.l.]: American Public Health Association, 2015.

BERESFORD, Tom P e colab. **Recent advances in cheese microbiology.** International Dairy Journal, v. 11, n. 4–7, p. 259–274, Jul 2001.

BLIGH, E. G. e DYER, W. J. **A rapid method of total lipid extraction and purification.** Canadian Journal of Biochemistry and Physiology, v. 37, n. 8, p. 911–917, 1 Ago 1959. Disponível em: <<http://www.nrcresearchpress.com/doi/10.1139/o59-099>>. Acesso em: 17 maio 2019.

BORELLI, Beatriz Martins e colab. **Traditional cheeses produced in Brazil: characterisation, production technologies and health implications.** Food microbiology fundamentals, challenges and health implications. New York: Nova Science Publishers, Inc, p. 161–189, 2016.

BRASIL. AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Instrução normativa nº 161 de 1º de julho de 2022.** Disponível em: <http://antigo.anvisa.gov.br/documents/10181/2718376/IN_161_2022_.pdf/b08d70cb-add6-47e3-a5d3-fa317c2d54b2>. Acesso em: 26 abr 2023.

BUDINICH, M.F. e colab. **Growth of *Lactobacillus paracasei* ATCC 334 in a cheese model system: A biochemical approach.** *Journal of Dairy Science*, v. 94, n. 11, p. 5263–5277, Nov 2011.

CAMPOS, Gabriela Zampieri e colab. **Microbiological characteristics of canastra cheese during manufacturing and ripening.** *Food Control*, v. 121, p. 107598, Mar 2021.
Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0956713520305144>>.

CARNEIRO, Juliana de Oliveira e colab. **Artisan minas cheese of Serro: proteolysis during ripening.** *Heliyon*, v. 6, n. 7, p. e04446, Jul 2020.

CASTRO, R.D. e colab. **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 of Dairy Science*, v. 99, n. 8, p. 6086–6096, Ago 2016. Disponível em:
<<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0022030216303502>>.

CEVOLI, Chiara e colab. **Screening of grated cheese authenticity by nir spectroscopy.** *Journal of Agricultural Engineering*, v. 44, n. 2s, p. 264–267, 2013.

CORREIA, Vinícius Tadeu da Veiga e ASSIS, Isabella Cristina Lopes De. **Queijos artesanais: Revisão de literatura.** *Nutritime*, v. 14, p. 8001–8008, 2017.

DA SILVA, Nayara Cristina e TUNES, Risia May Matos e CUNHA, Márcio Ferraz. **Avaliação química de queijos Minas artesanais frescos e curados em Uberaba, MG.** *PUBVET*, v. 6, p. Art-1357, 2012.

DE JESUS, J.C. e colab. **Quick identification of the time of maturation of artisanal minas cheese by ftir-ATR spectroscopy and multivariate techniques.** *Journal of the Brazilian Chemical Society*, v. 31, n. 10, p. 2000–2011, 2020a.

DE JESUS, J.C. e colab. **Quick identification of the time of maturation of artisanal minas cheese by ftir-ATR spectroscopy and multivariate techniques.** *Journal of the Brazilian Chemical Society*, v. 31, n. 10, p. 2000–2011, 2020b.

DE SOUZA, T.P. e colab. **Mycobiota of Minas artisanal cheese: Safety and quality.** *International Dairy Journal*, v. 120, p. 105085, Set 2021.

DEMIRCI, Talha e colab. **Lactic acid bacteria diversity and dynamics during ripening of traditional Turkish goatskin Tulum cheese produced in Mut region assessed by culturing and PCR-DGGE.** *LWT*, v. 138, p. 110701, Mar 2021.

DIEZHANDINO, I. e colab. **Microbiological, physico-chemical and proteolytic changes in a Spanish blue cheese during ripening (Valdeón cheese).** *Food Chemistry*, v. 168, p. 134–141, Fev 2015.

EMATER. EMPRESA DE ASSISTENCIA TECNICA E EXTENSÃO RURAL DO ESTADO DE MINAS GERAIS. **Queijo Minas Artesanal: patrimônio cultural imaterial brasileiro.**

EMATER. EMPRESA DE ASSISTENCIA TECNICA E EXTENSÃO RURAL DO ESTADO DE MINAS GERAIS. **Minas gerais poderá reconhecer mais uma região produtora do queijo minas artesanal.** Disponível em:

<https://www.emater.mg.gov.br/portal.do/site-noticias/minas-gerais-podera-reconhecer-mais-uma-regiao-produtora-do-queijo-minas-artesanal-/?flagweb=novosite_pagina_interna_noticia&id=25910>.

FAGAN, C. C. e colab. **Evaluating mid-infrared spectroscopy as a new technique for predicting sensory texture attributes of processed cheese.** *Journal of Dairy Science*, v. 90, n. 3, p. 1122–1132, 2007a.

FOX, Patrick F. e colab. *Microbiology of Cheese Ripening. Fundamentals of Cheese Science.* Boston, MA: Springer US, 2017. p. 333–390. Disponível em: <http://link.springer.com/10.1007/978-1-4899-7681-9_11>.

GLEESON, D. e O'CONNELL, A. e JORDAN, K. **Review of potential sources and control of thermophilic bacteria in bulk-tank milk.** *Irish Journal of Agricultural and Food Research*, v. 52, n. 2 SPEC. IS, p. 217–227, 2013.

GOBBETTI, Marco e colab. **Drivers that establish and assembly the lactic acid bacteria biota in cheeses.** *Trends in Food Science & Technology*, v. 78, p. 244–254, Ago 2018.

GONTIJO, Marco Túlio Pardini e colab. **Phylogenetic distribution of the bacteriocin repertoire of lactic acid bacteria species associated with artisanal cheese.** *Food Research International*, v. 128, p. 108783, Fev 2020.

HITCHINS, Anthony D. e JINNEMAN, Karen e CHEN, Yi. **Detection of *Listeria monocytogenes* in Foods and Environmental Samples, and Enumeration of *Listeria monocytogenes* in Foods.** *Bacteriological Analytical Manual*. 8. ed. [S.l.]: Food and drug administration, 2007. p. 47. Disponível em: <<https://www.fda.gov/food/laboratory-methods-food/bam-chapter-10-detection-listeria-monocytogenes-foods-and-environmental-samples-and-enumeration>>.

IMA. INSTITUTO MINEIRO DE AGROPECUÁRIA. **Portaria nº 694, 17 de novembro de 2004.** Disponível em: <<https://www.gov.br/inpi/pt-br/servicos/indicacoes-geograficas/arquivos/cadernos-de-especificacoes-tecnicas/Canastra.pdf>>.

IMA. INSTITUTO MINEIRO DE AGROPECUÁRIA. **Portaria nº 1736 de 27 de julho de 2017.** Disponível em: <<https://www.legisweb.com.br/legislacao/?id=346814>>.

IMA. INSTITUTO MINEIRO DE AGROPECUÁRIA. **Portaria nº 1985 de 16 de junho de 2020.** Disponível em: <<http://ima.mg.gov.br/files/1706/Ano-2020/18013/Portaria-nº-1985,-de-16-de-junho-de-2020.pdf>>.

IMA. INSTITUTO MINEIRO DE AGROPECUÁRIA. **Portaria nº1986 de 16 de junho de 2020.** Disponível em: <<http://ima.mg.gov.br/files/1706/Ano-2020/18014/Portaria-nº-1986,-de-16-de-junho-de-2020.pdf>>.

IPHAN. INSTITUTO DO PATRIMÔNIO HISTÓRICO E CULTURAL NACIONAL. **Queijo artesanal de Minas vira patrimônio cultural.** Disponível em:

<<http://portal.iphan.gov.br/noticias/detalhes/2033/queijo-artesanal-de-minas-vira-patrimonio-cultural#:~:text=O%20Conselho%20Consultivo%20do%20Instituto,minas%20como%20patri m%3%B4nio%20imaterial%20brasileiro.>>. Acesso em: 23 maio 2023.

IRLINGER, Françoise e MOUNIER, Jérôme. **Microbial interactions in cheese: implications for cheese quality and safety.** *Current Opinion in Biotechnology*, v. 20, n. 2, p. 142–148, Abr 2009.

JIA, Rong e colab. **Physicochemical and textural characteristics and volatile compounds of semihard goat cheese as affected by starter cultures.** *Journal of Dairy Science*, v. 104, n. 1, p. 270–280, Jan 2021.

KAMIMURA, Bruna A. e colab. **Amplicon sequencing reveals the bacterial diversity in milk, dairy premises and Serra da Canastra artisanal cheeses produced by three different farms.** *Food Microbiology*, v. 89, p. 103453, Ago 2020. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0740002020300423>>.

KAMIMURA, Bruna A. e colab. **Brazilian Artisanal Cheeses: An Overview of their Characteristics, Main Types and Regulatory Aspects.** *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, v. 18, n. 5, p. 1636–1657, 21 Set 2019.

KAMIMURA, Bruna Akie e colab. **Large-scale mapping of microbial diversity in artisanal Brazilian cheeses.** *Food Microbiology*, v. 80, p. 40–49, Jun 2019. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S074000201831027X>>.

KILCAWLEY, Kieran N. **Cheese Flavour.** *Fundamentals of Cheese Science*. Boston, MA: Springer US, 2017. p. 443–474.

KORNACKI, Jeffrey L. e GURTLER, Joshua B. e STAWICK, Bradley A. **Enterobacteriaceae, Coliforms, and Escherichia coli as Quality and Safety Indicators.** *Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods*. 8. ed. [S.l.]: American Public Health Association, 2015.

KOTHE, Caroline Isabel e MOHELLIBI, Nacer e RENAULT, Pierre. **Revealing the microbial heritage of traditional Brazilian cheeses through metagenomics.** *Food Research International*, v. 157, p. 111265, 1 Jul 2022. Acesso em: 3 maio 2023.

KOUSTA, Maria e colab. **Prevalence and sources of cheese contamination with pathogens at farm and processing levels.** *Food Control*, v. 21, n. 6, p. 805–815, Jun 2010. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0956713509003235>>.

LORENÇO, Mário Sérgio e colab. **Valorization of Polyphenols from Stryphnodendron adstringens Bark for Use as a Sustainable Inhibitor of Nitrogen Volatilization in Soil.** *ACS Agricultural Science & Technology*, 20 Out 2021. Disponível em: <<https://doi.org/10.1021/acsagscitech.1c00095>>.

MARGALHO, Larissa P. e colab. **Brazilian artisanal cheeses are rich and diverse sources of nonstarter lactic acid bacteria regarding technological, biopreservative, and safety properties—Insights through multivariate analysis.** *Journal of Dairy Science*, v. 103, n. 9,

p. 7908–7926, Set 2020. Disponível em:
<<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0022030220305336>>.

MAYO, Baltasar e colab. **Microbial Interactions within the Cheese Ecosystem and Their Application to Improve Quality and Safety**. *Foods*, v. 10, n. 3, p. 602, 12 Mar 2021.

MINOLTA, Konica. **Comunicação precisa da cor: controle de qualidade da percepção à instrumentação**. Disponível em:
<www.konicaminolta.com/sensingusa/support/product_applications>. Acesso em: 1 maio 2020.

MOUNIER, Jérôme e colab. **Microbial interactions within a cheese microbial community**. *Applied and environmental microbiology*, v. 74, n. 1, p. 172–181, 2008.

NARIMATSU, Agnes e colab. **Avaliação da proteólise e do derretimento do queijo prato obtido por ultrafiltração**. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v. 23, p. 177–182, Dez 2003.

NJONGMETA, Nenge Azefor e colab. **Acid-Producing Microorganisms**. *Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods*. 8. ed. [S.l.]: American Public Health Association, 2015.

OLIVEIRA, D F e colab. **Physical-chemical characterization of Minas handmade cheeses produced in microregions different of Minas Gerais**. *Revista Brasileira de Economia Doméstica*, v. 24, n. 2, p. 185–186, 2013.

PASZCZYK, Beata e ŁUCZYŃSKA, Joanna. **The Comparison of Fatty Acid Composition and Lipid Quality Indices in Hard Cow, Sheep, and Goat Cheeses**. *Foods*, v. 9, n. 11, p. 1667, 15 Nov 2020.

PENNA, Ana Lucia Barretto e GIGANTE, Mirna Lucia e TODOROV, Svetoslav Dimitrov. **Artisanal Brazilian Cheeses—History, Marketing, Technological and Microbiological Aspects**. *Foods*, v. 10, n. 7, p. 1562, 6 Jul 2021.

PERIN, Luana Martins e colab. **Bacterial ecology of artisanal Minas cheeses assessed by culture-dependent and -independent methods**. *Food Microbiology*, v. 65, p. 160–169, Ago 2017. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0740002016306086>>.

PRACHAROVA, P e colab. **Geotrichum candidum gene expression and metabolite accumulation inside the cells reflect the strain oxidative stress sensitivity and ability to produce flavour compounds**. *FEMS Yeast Research*, 5 Out 2018.

PUERARI, Cláudia e MAGALHÃES, Karina Teixeira e SCHWAN, Rosane Freitas. **New cocoa pulp-based kefir beverages: Microbiological, chemical composition and sensory analysis**. *Food Research International*, v. 48, n. 2, p. 634–640, Out 2012.

RADEMAKER, J.L.W. e colab. **The surface microflora dynamics of bacterial smear-ripened Tilsit cheese determined by T-RFLP DNA population fingerprint analysis**. *International Dairy Journal*, v. 15, n. 6–9, p. 785–794, Jun 2005.

RADOCAJ, Olga e DIMIC, Etelka e VUJASINOVIC, Vesna. **Optimization of the texture of fat-based spread containing hull-less pumpkin (*Cucurbita pepo* L.) seed press-cake**. *Acta Periodica Technologica*, n. 42, p. 131–143, 2011.

RAMOS, Cíntia Lacerda e colab. **Determination of dynamic characteristics of microbiota in a fermented beverage produced by Brazilian Amerindians using culture-dependent and culture-independent methods.** *International Journal of Food Microbiology*, v. 140, n. 2–3, p. 225–231, Jun 2010.

REALE, E. e colab. **Slower proteolysis in Cheddar cheese made from high-protein cheese milk is due to an elevated whey protein content.** *Journal of Dairy Science*, v. 105, n. 12, p. 9367–9386, Dez 2022.

RESENDE, M.F.S. e colab. **Queijo de minas artesanal da Serra da Canastra: influência da altitude das queijarias nas populações de bactérias acidoláticas.** *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v. 63, n. 6, p. 1567–1573, Dez 2011. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0102-09352011000600039&lng=pt&tlng=pt>.

RYCHLIK, Tomasz e colab. **Application of the PCR-DGGE technique to the fungal community of traditional Wielkopolska fried ripened curd cheese to determine its PGI authenticity.** *Food Control*, v. 73, p. 1074–1081, Mar 2017.

RYSER, Elliot T. e SCHUMAN, James D. *Mesophilic Aerobic Plate Count.* *Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods*. 8. ed. [S.l.]: American Public Health Association, 2015. .

RYU, Dojin e WOLF-HALL, Charlene. *Yeasts and Molds.* *Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods*. 8. ed. [S.l.]: American Public Health Association, 2015. .

SANT'ANNA, Felipe Machado e colab. **Microbial shifts in Minas artisanal cheeses from the Serra do Salitre region of Minas Gerais, Brazil throughout ripening time.** *Food Microbiology*, v. 82, p. 349–362, Set 2019a. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0740002018309870>>.

SANT'ANNA, Felipe Machado e colab. **Microbial shifts in Minas artisanal cheeses from the Serra do Salitre region of Minas Gerais, Brazil throughout ripening time.** *Food Microbiology*, v. 82, p. 349–362, 1 Set 2019b. Acesso em: 3 maio 2023.

SHAFIUR RAHMAN, Mohammad e AL-MAHROUQI, Abdullah Issa. **Instrumental texture profile analysis of gelatin gel extracted from grouper skin and commercial (bovine and porcine) gelatin gels.** *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, v. 60, n. sup7, p. 229–242, 21 Jan 2009.

SUBRAMANIAN, Anand e colab. **Monitoring amino acids, organic acids, and ripening changes in Cheddar cheese using Fourier-transform infrared spectroscopy.** *International Dairy Journal*, v. 21, n. 6, p. 434–440, 2011a.

SUBRAMANIAN, Anand e colab. **Monitoring amino acids, organic acids, and ripening changes in Cheddar cheese using Fourier-transform infrared spectroscopy.** *International Dairy Journal*, v. 21, n. 6, p. 434–440, 2011b.

TEMMERMAN, Robin e HUYS, Geert e SWINGS, Jean. **Identification of lactic acid bacteria: culture-dependent and culture-independent methods**. Trends in Food Science & Technology, v. 15, n. 7–8, p. 348–359, 1 Jul 2004. Acesso em: 3 maio 2023.

TURAN, Hulya e SÖNMEZ, Gülşah e KAYA, Yalçın. **Fatty acid profile and proximate composition of the thornback ray (*Raja clavata*, L. 1758) from the Sinop coast in the Black Sea**. Journal of Fisheries Sciences.com, v. 1, n. 2, p. 97–103, 1 Abr 2007.

XIA, Xiaofeng e colab. **Effect of heat treatment on whey protein-reduced micellar casein concentrate: A study of texture, proteolysis levels and volatile profiles of Cheddar cheeses produced therefrom**. International Dairy Journal, v. 129, p. 105280, Jun 2022.

APÊNDICE I - Material suplementar

Tabela S1. Physicochemical (g.100 g⁻¹) and colorimetric parameters, organic acids (mg. g⁻¹) and lactose (mg. g⁻¹) of minas cheese artisanal produced on different farms in the Canastra microregion ripened for 30 days.¹

Parameters	Bambuí							Tapirai						
	0	5	10	15	20	25	30	0	5	10	15	20	25	30
<i>Moisture</i>	51,64±1,05 ^{ab}	43,18±1,92 ^{ba}	38,69±4,66 ^{ca}	32,89±2,12 ^{da}	30,39±2,27 ^{da}	23,76±1,93 ^{ca}	20,73±0,98 ^{ab}	29,73±0,46 ^{ab}	25,65±0,20 ^{bb}	19,73±1,41 ^{cb}	19,05±1,00 ^{cb}	17,72±2,40 ^{db}	16,71±1,30 ^{db}	13,99±0,36 ^{db}
<i>AW</i>	0,97±0,00 ^{ab}	0,96±0,01 ^{ab}	0,95±0,00 ^{ab}	0,95±0,00 ^{ab}	0,91±0,01 ^{ba}	0,88±0,01 ^{ca}	0,86±0,01 ^{ca}	0,98±0,00 ^{ab}	0,95±0,01 ^{ba}	0,87±0,03 ^{cb}	0,84±0,02 ^{cb}	0,84±0,05 ^{cb}	0,85±0,02 ^{ca}	0,85±0,01 ^{ca}
<i>Salt diffusion</i>	1,03±0,02 ^{ab}	0,86±0,04 ^{ba}	0,77±0,049 ^{ca}	0,77±0,049 ^{ca}	0,61±0,05 ^{ca}	0,47±0,04 ^{ca}	0,41±0,02 ^{ca}	0,59±0,01 ^{ab}	0,51±0,00 ^{bb}	0,39±0,03 ^{bb}	0,38±0,02 ^{bb}	0,35±0,05 ^{bb}	0,33±0,03 ^{cb}	0,28±0,01 ^{cb}
<i>Protein</i>	21,71±1,19 ^{ab}	12,54±2,88 ^{bb}	12,14±2,43 ^{bb}	11,27±1,14 ^{bb}	10,16±0,96 ^{bb}	10,16±0,30 ^{bb}	9,52±0,36 ^{ba}	35,21±0,66 ^{ab}	35,57±0,34 ^{ab}	36,68±0,41 ^{ab}	38,98±1,97 ^{ab}	23,62±8,34 ^{ba}	18,26±3,17 ^{bb}	12,14±0,36 ^{ba}
<i>EI</i>	24,23±1,02 ^{bb}	26,30±1,02 ^{bb}	28,41±1,89 ^{bb}	30,29±1,97 ^{bb}	30,91±2,13 ^{ba}	31,00±0,92 ^{ba}	31,10±0,58 ^{ba}	31,32±0,88 ^{ab}	35,19±1,65 ^{ba}	39,04±1,76 ^{ba}	39,82±1,44 ^{ba}	32,40±1,44 ^{ca}	30,82±2,03 ^{ca}	29,23±2,18 ^{ca}
<i>DI</i>	13,81±2,27 ^{ab}	18,69±1,92 ^{ab}	23,58±1,67 ^{ab}	19,87±0,23 ^{ba}	18,94±2,58 ^{ba}	20,96±1,55 ^{ba}	22,97±2,03 ^{ba}	14,18±0,21 ^{ca}	17,75±2,31 ^{ba}	21,33±2,31 ^{ba}	15,91±1,51 ^{bb}	20,63±1,88 ^{ba}	17,29±1,49 ^{bb}	13,95±1,46 ^{bb}
<i>Lipid</i>	21,67±0,00 ^{ab}	21,67±0,00 ^{ab}	21,67±0,00 ^{ab}	21,67±0,00 ^{ab}	21,67±0,00 ^{ab}	21,67±0,00 ^{ab}	21,67±0,00 ^{ab}	31,33±0,00 ^{bb}	31,33±0,00 ^{bb}	31,33±0,00 ^{bb}	31,33±0,00 ^{bb}	31,33±0,00 ^{bb}	31,33±0,00 ^{bb}	31,33±0,00 ^{bb}
<i>L</i>	91,12±0,07 ^{ab}	84,82±1,74 ^{ba}	77,68±1,53 ^{ba}	74,70±1,34 ^{ca}	72,50±1,31 ^{ca}	71,18±1,19 ^{ca}	69,22±0,99 ^{ca}	90,11±0,65 ^{ab}	77,21±0,67 ^{bb}	71,50±1,65 ^{cb}	71,36±0,32 ^{cb}	71,08±0,98 ^{ca}	71,04±0,67 ^{ca}	70,78±0,44 ^{ca}
<i>a*</i>	-1,81±0,11 ^{ab}	-0,26±3,83 ^{ba}	1,35±6,22 ^{ca}	2,82±4,17 ^{ca}	3,52±5,25 ^{ca}	2,93±5,20 ^{ca}	2,57±2,76 ^{ca}	-2,12±1,66 ^{ab}	-1,13±0,76 ^{bb}	-1,28±1,98 ^{bb}	-1,42±1,44 ^{bb}	-1,80±2,47 ^{bb}	-1,89±1,84 ^{bb}	-1,96±2,07 ^{bb}
<i>b*</i>	19,23±0,09 ^{ab}	25,18±1,72 ^{ab}	26,08±2,91 ^{ab}	26,05±2,19 ^{ab}	24,89±2,52 ^{ab}	24,22±2,38 ^{ab}	24,00±1,54 ^{ab}	18,88±0,91 ^{ca}	18,88±0,91 ^{ca}	21,25±1,45 ^{ab}	21,44±3,51 ^{ab}	19,02±1,00 ^{bb}	18,79±0,78 ^{bb}	19,20±0,93 ^{bb}
<i>YI</i>	30,33±0,13 ^{ba}	42,65±0,44 ^{ca}	48,08±0,36 ^{ca}	50,27 ±0,81 ^{ca}	49,54±1,44 ^{ca}	49,66±0,15 ^{ca}	50,63±0,07 ^{ca}	30,00±0,16 ^{ab}	44,01±0,11 ^{ca}	47,67±0,17 ^{ca}	39,12±0,08 ^{bb}	38,20±0,11 ^{bb}	37,65±0,22 ^{bb}	39,88±0,30 ^{bb}
<i>Chroma</i>	19,32±0,09 ^{ab}	26,71±3,79 ^{ab}	27,71±5,23 ^{ab}	25,85±2,44 ^{ab}	25,10±2,55 ^{ab}	24,43±2,37 ^{ab}	24,33±1,28 ^{ab}	18,96±0,84 ^{ab}	26,20±4,06 ^{ab}	21,31±1,45 ^{ab}	19,51±0,77 ^{ab}	19,17±1,03 ^{ab}	18,92±0,79 ^{ab}	19,64±1,36 ^{ab}
<i>Hue^o</i>	95,45±0,24 ^{ab}	89,93±0,50 ^{ba}	87,00±0,68 ^{bb}	84,74±0,68 ^{bb}	84,29±0,25 ^{bb}	84,75±0,29 ^{bb}	83,30±1,45 ^{bb}	96,50±0,74 ^{ab}	92,78±0,20 ^{bb}	93,60±0,80 ^{ca}	94,52±0,37 ^{ca}	94,70±0,50 ^{ca}	95,84±1,44 ^{ca}	94,80±0,09 ^{ca}
<i>Hardeness</i>	25,98±16,92 ^{ca}	42,47±15,49 ^{ca}	58,66±8,39 ^{ba}	66,86±7,57 ^{bb}	123,66±10,54 ^{bb}	113,40 ±10,32 ^{bb}	101,04±21,47 ^{bb}	18,68±15,2 ^{ba}	32,12±14,23 ^{ba}	55,71±2,57 ^{ca}	222,11±13,54 ^{ba}	233,41±14,23 ^{ba}	235,65±23,12 ^{ba}	327,09±21,02 ^{ca}
<i>Cohesiveness</i>	0,54±0,003 ^{ab}	0,42±0,07 ^{ab}	0,33±0,03 ^{bb}	0,27±0,01 ^{bb}	0,38±0,00 ^{bb}	0,22±0,00 ^{ba}	0,23±0,01 ^{bb}	0,65±0,29 ^{ca}	0,48±0,08 ^{ba}	0,082±0,06 ^{ca}	0,53±0,05 ^{ba}	0,65±0,18 ^{ca}	0,44±0,04 ^{bb}	0,49±0,03 ^{ba}
<i>Springness</i>	0,88±0,01 ^{ab}	0,77±0,07 ^{ab}	0,63±0,05 ^{bb}	0,60±0,06 ^{bb}	0,74±0,02 ^{ba}	0,63±0,03 ^{bb}	0,60±0,02 ^{ca}	0,40±0,06 ^{bb}	0,78±0,05 ^{ca}	0,39±0,13 ^{bb}	0,75±0,04 ^{ca}	0,28±0,01 ^{bb}	0,79±0,03 ^{ba}	0,68±0,05 ^{ca}
<i>Cheewiness</i>	13,42±3,74 ^{ba}	14,05±2,34 ^{ba}	14,29±2,56 ^{ba}	10,49±6,69 ^{ca}	34,88±2,54 ^{ab}	17,26±4,00 ^{bb}	13,97±2,03 ^{bb}	5,44±8,39 ^{ca}	13,88±2,34 ^{ca}	7,39±4,01 ^{ca}	12,45±1,23 ^{ca}	13,19±2,23 ^{cb}	73,23±2,35 ^{ca}	133,41±4,56 ^{ca}
<i>Resilience</i>	0,18±0,02 ^{bb}	0,10±0,10 ^{bb}	0,08±0,08 ^{bb}	0,06±0,07 ^{bb}	0,10±0,01 ^{bb}	0,05±0,00 ^{bb}	0,05±0,00 ^{bb}	0,30±0,15 ^{ab}	0,16±0,03 ^{ba}	0,35±0,07 ^{ab}	0,17±0,03 ^{ba}	0,29±0,07 ^{ca}	0,14±0,01 ^{ba}	0,17±0,01 ^{ba}
<i>Lactose</i>	6,71±0,59 ^{ab}	1,93±0,14 ^{ab}	1,10±0,10 ^{ab}	3,70±0,45 ^{ba}	2,40±0,21 ^{ab}	2,76±0,53 ^{ca}	2,77±0,14 ^{ca}	2,00±0,19 ^{bb}	1,74±0,12 ^{ca}	1,57±0,17 ^{ca}	1,81±0,30 ^{bb}	1,88±0,20 ^{bb}	1,40±0,06 ^{bb}	1,81±0,04 ^{bb}
<i>Organic acids</i>														
<i>Citric acid</i>	4,70±0,44 ^{bb}	4,68±0,71 ^{bb}	2,55±0,40 ^{bb}	2,55±0,40 ^{ab}	0,81±0,04 ^{bb}	ND	ND	6,38±1,77 ^{ba}	6,34±0,23 ^{ca}	6,26±0,56 ^{ca}	2,55±0,40 ^{bb}	4,70±1,33 ^{ba}	ND	ND
<i>Tartaric acid</i>	0,34±0,03 ^{ab}	0,29±0,03 ^{ab}	0,24±0,02 ^{ab}	0,24±0,02 ^{ab}	0,25±0,01 ^{ab}	0,33±0,03 ^{ba}	0,24±0,03 ^{bb}	ND	ND	ND	ND	ND	ND	0,72±0,08 ^{ba}
<i>Malic acid</i>	0,39±0,02 ^{bb}	0,42±0,05 ^{bb}	0,30±0,05 ^{bb}	0,78±0,12 ^{bb}	0,28±0,02 ^{bb}	0,32±0,05 ^{ca}	0,22±0,02 ^{ca}	1,13±0,08 ^{ba}	1,44±0,71 ^{ca}	0,97±0,04 ^{ba}	1,43±0,07 ^{ca}	0,78±0,04 ^{ba}	ND	0,14±0,01 ^{ca}
<i>Succinic acid</i>	1,50±0,24 ^{ca}	0,44±0,05 ^{ba}	0,46±0,01 ^{ba}	0,28±0,02 ^{ba}	0,38±0,04 ^{ba}	0,40±0,03 ^{bb}	0,51±0,07 ^{ba}	0,58±0,08 ^{bb}	0,63±0,10 ^{ba}	0,63±0,06 ^{ba}	0,44±0,13 ^{ba}	0,45±0,06 ^{ba}	1,00±0,62 ^{ba}	0,47±0,07 ^{ba}
<i>Lactic acid</i>	23,04±1,10 ^{ab}	24,80±2,48 ^{ab}	25,51±1,22 ^{bb}	21,58±1,03 ^{ab}	20,76±0,55 ^{bb}	19,62±2,49 ^{bb}	15,92±11,33 ^{bb}	22,88±1,58 ^{ab}	28,53±1,88 ^{ab}	35,18±4,86 ^{ab}	26,88±4,18 ^{ab}	31,33±2,12 ^{ca}	28,07±5,12 ^{ca}	30,31±4,90 ^{ca}
<i>Acetic acid</i>	0,06±0,01 ^{ca}	0,23±0,04 ^{ca}	0,42±0,10 ^{ca}	1,62±0,31 ^{ba}	2,23±0,67 ^{ba}	2,56±0,21 ^{ca}	2,65±0,23 ^{ca}	0,13±0,02 ^{ba}	0,19±0,03 ^{ba}	0,33±0,13 ^{ba}	0,78±0,13 ^{ab}	0,97±0,20 ^{bb}	0,34±0,13 ^{bb}	0,41±0,20 ^{bb}
<i>Propionic acid</i>	ND	ND	0,18±0,03 ^{ca}	0,55±0,06 ^{ca}	0,49±0,13 ^{ca}	0,70±0,09 ^{bb}	0,99±0,29 ^{ca}	ND	ND	0,28±0,15 ^{ca}	0,35±0,06 ^{ca}	0,61±0,10 ^{ba}	1,60±0,63 ^{ca}	0,71±0,18 ^{ba}
<i>Butyric acid</i>	0,14±0,04 ^{ca}	0,026±0,01 ^{ba}	0,41±0,05 ^{ba}	0,41±0,05 ^{ba}	0,36±0,06 ^{bb}	0,37±0,03 ^{bb}	0,41±0,06 ^{bb}	0,23±0,05 ^{ca}	0,31±0,11 ^{ca}	0,37±0,13 ^{ba}	0,40±0,11 ^{ba}	0,50±0,04 ^b	0,71±0,06 ^{ca}	0,71±0,06 ^{ca}
<i>Isovaleric acid</i>	ND	2,06±0,79 ^{ca}	4,00±0,26 ^{ba}	4,00±0,26 ^{ba}	5,13±0,44 ^{ba}	6,66±0,68 ^{ca}	7,60±0,13 ^{ca}	0,79±0,18 ^d	2,02±1,57 ^{ca}	3,83±0,46 ^{ca}	2,30±0,27 ^{bb}	4,37±0,40 ^{ca}	2,95±0,57 ^{bb}	2,95±0,57 ^{bb}

¹Different lowercase letters in the same row show statistical difference by Scott-knott test with $p < 0.05$, while different uppercase letters show significance by T-test with $p < 0.05$. ND means that the compound was not detected

Table S2. Volatile compounds (%) determined by HS-SPME/GC-MS in minas cheese artisanal produced on different farms in the Canastra microregion ripened for 30 days.¹

No.	Class	Volatile compounds	Retention Time	Retention Index	Bambuí						Tapirai							
					0	5	10	15	20	25	30	0	5	10	15	20	25	30
FFA/Acids																		
1		<i>Pentadecanoic acid</i>	42,706	1869	0,26	0,22	0,20	0,18	0,28	0,26	0,55	1,58	1,47	3,88	1,69	2,03	1,84	1,13
2		<i>Hexadecanoic acid</i>	42,674	1968	0,26	ND	0,23	0,26	0,28	0,26	0,60	1,58	ND	3,88	ND	2,02	1,84	1,25
3		<i>Isobutyric anhydride</i>	19,490	992	ND	ND	ND	ND	ND	ND	7,65	34,11	31,95	21,53	22,94	29,77	28,97	23,05
		<i>Total</i>			0,53	0,22	0,43	0,44	0,55	0,53	8,80	37,27	33,41	29,30	24,63	33,82	32,65	25,43
Alcohols																		
4		<i>3-methyl-1-Butanol</i>	8,259	697	8,75	7,02	14,18	6,08	3,92	5,64	3,12	ND						
5		<i>1-Octanol</i>	19,145	1059	0,38	0,25	0,23	0,20	0,00	0,00	0,00	ND						
6		<i>2-Ethyl-1-hexanol</i>	16,997	995	3,13	1,07	0,98	1,24	0,41	0,32	0,00	ND						
7		<i>2-Hexyl-1-Decanol</i>	25,977	1790	1,25	1,16	1,06	1,20	1,70	1,22	1,75	0,62	1,13	2,51	1,79	1,07	1,45	1,46
8		<i>α-Terpineol</i>	23,193	1143	0,30	1,77	1,62	0,25	1,99	0,20	0,45	ND						
9		<i>2-butyl-1-Octanol</i>	26,039	1393	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	0,62	0,00	2,51	2,73	1,07	1,45	1,78
10		<i>1-Nonanol</i>	22,116	1159	0,20	0,11	0,10	0,12	0,09	0,10	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
11		<i>Phenylethyl Alcohol</i>	27,910	1136	72,49	74,61	68,06	73,40	65,40	66,35	48,38	1,21	4,17	3,25	2,18	1,64	1,90	0,74
		<i>Total</i>			86,51	85,99	86,21	82,50	73,51	73,82	53,71	2,45	5,30	8,27	6,70	3,78	4,80	3,98
Aldehydes																		
12		<i>Hexadecane</i>	20,769	1612	0,43	0,39	0,36	0,54	0,71	0,45	0,44	ND	ND	ND	ND	ND	ND	1,08
13		<i>1-Heptadecene</i>	24,529	1701	0,27	0,30	0,27	0,46	0,73	0,28	0,35	0,51	2,81	3,44	2,79	1,03	1,25	1,38
14		<i>Heptadecanal</i>	30,200	1899	0,00	0,23	0,21	0,29	0,85	0,30	0,54	ND						
15		<i>1-Pentadecene</i>	18,911	1502	0,43	0,52	0,47	0,44	0,58	0,39	0,74	1,03	5,59	6,71	5,95	2,04	2,55	2,76
16		<i>Heptadecane</i>	23,551	1711	0,49	0,47	0,43	0,53	0,72	0,51	0,66	0,37	1,37	1,96	1,75	0,68	0,94	0,93
17		<i>Heptadecanal</i>	30,211	1899	0,00	0,23	0,21	0,29	0,85	0,30	0,54	0,87	2,66	3,47	3,24	1,66	1,61	1,27
18		<i>Tetradecanal</i>	30,229	1601	0,09	0,29	0,27	0,54	0,80	0,31	0,41	ND	ND	ND	3,27	1,23	1,55	1,70
19		<i>Tridecanal</i>	32,064	1502	0,20	0,19	0,17	0,26	0,48	0,26	1,09	1,09	2,08	1,37	2,32	2,18	2,26	2,46
20		<i>3,7,11,15-tetramethyl-2-hexadecene</i>	27,435	1802	0,48	0,42	0,39	0,39	0,58	0,52	0,90	ND						
		<i>Total</i>			2,40	3,04	2,77	3,74	6,31	3,32	5,67	3,88	14,51	16,95	19,32	8,83	10,17	11,58
Ketones																		
21		<i>2-Tridecanone</i>	25,816	1449	ND	ND	ND	ND	ND	0,80	1,23	2,92	2,70	2,27	2,21	2,77	2,05	1,90
22		<i>2-Pentadecanone</i>	30,120	1648	0,24	0,27	0,25	0,36	0,58	0,32	1,88	7,26	ND	5,56	2,62	6,91	5,43	4,45
23		<i>2-Nonadecanone</i>	33,633	2046	0,15	0,14	0,13	0,22	0,35	0,11	2,64	0,88	ND	ND	ND	1,20	0,90	0,78
24		<i>6,10,14-trimethyl-2-Pentadecanone</i>	31,944	1754	ND	ND	ND	ND	ND	ND	0,16	ND						
25		<i>2-Undecanone</i>	20,141	1251	0,51	0,45	0,41	0,94	1,63	2,12	1,21	2,17	ND	ND	ND	ND	ND	ND
26		<i>4-Hexadecanone</i>	32,530	1748	ND	ND	ND	ND	ND	ND	1,66	0,51	2,81	3,44	2,79	1,04	1,25	1,37
27		<i>4-Heptadecanone</i>	24,220	1847	ND	ND	ND	ND	ND	ND	0,35	5,29	5,84	3,89	4,19	4,31	4,08	4,19
28		<i>4-Dodecanone</i>	28,841	1350	ND	ND	ND	ND	ND	ND	0,44	1,82	2,02	ND	ND	1,22	1,20	1,27
29		<i>8-Pentadecanone</i>	36,733	1648	ND	ND	ND	ND	ND	ND	0,35	ND						
30		<i>8-Octadecanone</i>	38,372	1946	ND	ND	ND	ND	ND	ND	0,84	1,41	ND	ND	ND	1,58	ND	ND
31		<i>10-Nonadecanone</i>	43,400	2046	ND	ND	ND	ND	ND	ND	0,76	ND						
32		<i>11-methyl-4-Dodecanone</i>	24,242	1385	ND	ND	ND	ND	ND	ND	0,00	1,53	2,13	ND	ND	1,08	1,13	1,00
33		<i>12-Tricosanone</i>	40,999	2443	ND	ND	ND	ND	ND	ND	0,64	0,79	ND	ND	ND	ND	ND	ND
34		<i>14-Heptacosanone</i>	46,229	2841	ND	ND	ND	ND	ND	ND	0,57	0,00	ND	ND	ND	ND	ND	ND
		<i>Total</i>			0,90	0,86	0,79	1,52	2,56	3,35	12,74	24,58	15,49	15,16	11,81	20,11	16,05	14,95
Ester																		
35		<i>Ethyl trans-4-decenoate</i>	22,598	1389	ND	ND	ND	0,13	0,28	0,32	0,21	ND						

36	<i>Z-(13,14-Epoxy)tetradec-11-en-1-ol acetate</i>	37,009	1877	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	1,08	0,00	0,00	0,00	1,36	1,06	0,92
37	<i>Phenethyl acetate</i>	25,558	1259	5,91	5,69	5,19	2,50	2,29	2,51	1,90	4,14	8,56	6,49	8,28	3,87	3,44	1,97
38	<i>Octanoic acid, methyl ester</i>	13,538	1083	0,98	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
39	<i>Decanoic acid, methyl ester</i>	19,881	1282	0,82	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
40	<i>Octanoic acid, ethyl ester</i>	15,060	1183	0,00	2,01	1,84	3,72	5,84	6,26	1,98	ND						
41	<i>Octadecanoic acid, 2-propenyl ester</i>	35,869	2266	ND	ND	ND	ND	ND	ND	0,29	ND						
42	<i>(Z)-4-Decenoic acid ethyl ester</i>	22,599	1389	0,00	0,47	0,00	0,25	0,32	0,41	0,24	ND						
43	<i>Undecanoic acid, ethyl ester</i>	21,230	1481	0,00	0,00	0,00	2,61	4,33	5,42	2,67	ND	ND	ND	ND	0,67	1,84	8,78
44	<i>Decanoic acid, ethyl ester</i>	26,524	1381	0,08	0,19	0,17	0,38	0,61	0,71	0,97	ND	ND	ND	ND	0,00	0,00	0,00
45	<i>Tetradecanoic acid, ethyl ester</i>	30,540	1759	ND	ND	ND	0,12	0,20	0,22	0,72	ND	ND	ND	1,88	1,14	1,78	5,36
46	<i>Hexanoic acid, 2-methylbutyl ester</i>	25,169	1218	ND	ND	ND	ND	ND	ND	2,57	11,06	9,79	6,90	6,89	9,72	8,84	7,20
47	<i>Octanoic acid, 3-methylbutyl ester</i>	21,946	1417	ND	ND	ND	ND	0,29	0,33	ND							
48	<i>Oleic acid, methyl ester</i>	36,635	2085	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	0,58	ND	ND	ND	ND	ND	ND
49	<i>Hexadecanoic acid, ethyl ester</i>	25,169	1218	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	2,01	1,69	1,64	4,30
50	<i>Eicosanoic acid, ethyl ester</i>	33,914	2375	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	2,16	1,69	1,64	4,30
	<i>Total</i>			7,78	8,36	7,20	9,70	14,17	16,18	14,12	27,92	28,14	20,28	28,13	29,85	29,08	39,87
	Others																
51	<i>Butylated Hydroxytoluene</i>	27,623	1668	0,66	0,53	0,48	0,56	0,79	0,68	0,44	ND						
52	<i>Benzothiazole</i>	28,811	1208	0,41	0,00	0,37	0,43	0,43	0,35	0,44	ND						
53	<i>2H-Pyran-2-one, tetrahydro-6-pentyl-</i>	33,514	1404	0,12	0,26	0,23	0,22	0,47	0,40	0,84	ND						
54	<i>Eicosane</i>	29,935	2009	0,12	0,15	0,14	0,15	0,20	0,09	0,00	ND						
	<i>Total</i>			1,30	0,93	1,22	1,35	1,88	1,52	1,72	ND						

¹ND means that the compound was not detected

Tabela S3. Identification of eukaryotes and prokaryotes by sequencing portions of the V3 16s rRNA region and fragment of the 18s rRNA gene, respectively, from two farms producing minas artisanal cheese from the canastra microregion.¹

Farm	Bandas	Closest relatives	Genbank accession ID	Similarity (%)
	2	<i>Kluyveromyces lactis</i>	<u>CP042458.2</u>	99,6
	4	NI	-	-
	6	<i>Kluyveromyces lactis</i>	<u>CP042458.2</u>	97,21
	7	<i>Kluyveromyces lactis</i>	<u>CP042458.2</u>	90,74
	8	<i>Kluyveromyces lactis</i>	<u>CP042458.2</u>	99,72
	9	<i>Kluyveromyces lactis</i>	<u>CP042458.2</u>	99,45
	10	<i>Kluyveromyces lactis</i>	<u>CP042458.2</u>	99,16
	11	<i>Kluyveromyces lactis</i>	<u>CP042458.2</u>	99,46
	12	<i>Candida sp.</i>	<u>MH545927.1</u>	87,36
	13	<i>Kluyveromyces lactis</i>	<u>CP042458.2</u>	97,01
	14	<i>Kluyveromyces lactis</i>	<u>CP042458.2</u>	99,19
	15	<i>Kluyveromyces lactis</i>	<u>CP042458.2</u>	99,40
	16	<i>Kluyveromyces lactis</i>	<u>CP042458.2</u>	99,44
	17	<i>Kluyveromyces lactis</i>	<u>CP042458.2</u>	91,62
	18	<i>Lactococcus garvieae</i>	<u>OP420803.1</u>	96,34
	19	<i>Lactococcus garvieae</i>	<u>MH295803.1</u>	97,57
	20	<i>Lactococcus sp.</i>	<u>LC119137.1</u>	88,68
Tapiraí	21	<i>Lactococcus sp.</i>	<u>LC119137.1</u>	83,12
	24	<i>Lactococcus lactis subsp. lactis</i>	<u>KF879131.1</u>	93,21
	25	<i>Lactococcus lactis subsp. lactis</i>	<u>AY533297.1</u>	93,9
	26	<i>Lactococcus lactis subsp. lactis</i>	<u>LC119137.1</u>	98,47
	27	<i>Streptococcus sp.</i>	<u>NR_115276.1</u>	94,55
	34	<i>Lactococcus lactis subsp. lactis</i>	<u>EU337111.1</u>	98,79
	36	<i>Lactococcus lactis subsp. lactis</i>	<u>EU337111.1</u>	98,79
	38	<i>Lactococcus lactis subsp. lactis</i>	<u>EU337111.1</u>	97,6
	39	<i>Lactococcus lactis subsp. lactis</i>	<u>EU337111.1</u>	93,58
	40	<i>Corynebacterium variable</i>	<u>MT573863.1</u>	92,47
	41	<i>Corynebacterium variable</i>	<u>MT573863.1</u>	96,21
	43	<i>Corynebacterium variable</i>	<u>MT573863.1</u>	100
	44	<i>Corynebacterium variable</i>	<u>MT573863.1</u>	96,99
	45	NI	-	-
	47	<i>Lentilactobacillus hilgardii</i>	<u>CP050262.1</u>	96,36
	54	<i>Lactococcus lactis subsp. lactis</i>	<u>LC119137.1</u>	93,96
	55	<i>Lactococcus lactis subsp. lactis</i>	<u>EU337111.1</u>	95,76
	56	<i>Lactococcus lactis subsp. lactis</i>	<u>LC119137.1</u>	92,62

	60	<i>Lactococcus lactis subsp. lactis</i>	<u>EU337111.1</u>	94,51
	61	<i>Lactococcus sp.</i>	<u>MF280163.1</u>	86,93
	62	<i>Corynebacterium sp.</i>	<u>MK895548.1</u>	85,23
	66	<i>Diutina sp.</i>	<u>MK394156.1</u>	86,96
	68	<i>Diutina sp.</i>	<u>MK394156.1</u>	86,96
	69	<i>Diutina sp.</i>	<u>NG_065469.1</u>	92,54
	70	<i>Kluyveromyces lactis</i>	<u>CP042458.1</u>	98,61
	71	<i>Kluyveromyces lactis</i>	<u>CP042458.1</u>	92,08
	72	<i>Kluyveromyces lactis</i>	<u>CP042458.1</u>	92,08
	73	<i>Meyerozyma sp.</i>	<u>KM222231.1</u>	83,56
	74	<i>Diutina sp.</i>	<u>MK394156.1</u>	88
	75	<i>Diutina catenulata</i>	<u>MK394156.1</u>	98,95
	76	<i>Diutina catenulata</i>	<u>MK394156.1</u>	98,95
	90	<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	<u>OQ581794.1</u>	100
	91	<i>uncultured bacterium</i>	<u>KT768721.1</u>	85,11
	92	<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	<u>JF920014.1</u>	98,71
	95	<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	<u>OQ377795.1</u>	99,28
	98	<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	<u>CP054831.1</u>	100
	99	<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	<u>OQ603042.1</u>	98,15
	103	<i>Latilactobacillus curvatus</i>	<u>OQ569417.1</u>	98,71
Bambuí	104	<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	<u>MN493063.1</u>	97,44
	105	<i>Latilactobacillus curvatus</i>	<u>DQ336384.1</u>	97,43
	106	<i>uncultured Trichococcus sp.</i>	<u>EU919224.1</u>	87,91
	109	<i>Lactococcus lactis</i>	<u>OP714092.1</u>	99,34
	118	<i>Uncultured Rhodanobacter sp.</i>	<u>LN649253.1</u>	82,22
	120	<i>Corynebacterium variabile</i>	<u>MT573863.1</u>	96,35
	121	<i>Corynebacterium variabile</i>	<u>MT573863.1</u>	100
	123	<i>Corynebacterium variabile</i>	<u>MT573863.1</u>	98,53
	125	<i>uncultured Streptomyces</i>	<u>LN649246.1</u>	89,19
	126	<i>Corynebacterium variabile</i>	<u>MT573863.1</u>	86,8
	127	<i>uncultured proteobacterium</i>	<u>GU219959.1</u>	100
	128	<i>uncultured proteobacterium</i>	<u>GU219959.2</u>	100
	129	<i>Corynebacterium variabile</i>	<u>KP114214.1</u>	100
	130	<i>Corynebacterium variabile</i>	<u>KP114214.1</u>	98,52
	138	<i>Paenibacillus sp.</i>	<u>AB934318.1</u>	86,45
	139	<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	<u>JF920014.1</u>	99,34
	140	<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	<u>CP102563.2</u>	100
	144	<i>Staphylococcus sp.</i>	<u>MN540905.1</u>	85,99
	145	<i>Staphylococcus sp.</i>	<u>MN540905.2</u>	85,99

¹NI: non indentified.

ARTIGO II - DINÂMICA DE POPULAÇÃO E SOBREVIVÊNCIA DE *Listeria monocytogenes* E *Staphylococcus aureus* DURANTE A MATURAÇÃO DE QUEIJOS MINAS ARTESANAIS DA REGIÃO DA CANASTRA

Artigo redigido conforme a norma para publicação periódica científica NBR 6022

RESUMO

O queijo minas artesanal (QMA) é um produto tradicional em sua forma de manufatura, pois é produzido a partir de leite cru e adição de cultura endógena denominado 'pingo'. O uso de leite cru é um ponto de preocupação para os órgãos regulamentadores da produção e distribuição desses queijos. O objetivo deste trabalho foi avaliar a inocuidade de queijos minas artesanais da região da Canastra durante a maturação de trinta dias, através de análises microbiológicas, químicas e moleculares. O estudo foi realizado em queijos produzidos em duas queijarias localizadas na microrregião da Canastra: Bambuí (B) e Tapiraí (T), o qual foi inoculado, separadamente, *Staphylococcus aureus* (S; 6 log) e *Listeria monocytogenes* (L; ~ 5 log). A inoculação afetou a dinâmica de população do microrganismos ao longo do tempo, bem como as características individuais dos queijos produzidas em diferentes fazendas influenciou na viabilidade dos patógenos inoculados. A análise de qPCR, demonstrou redução da população dos patógenos ao longo do tempo. As bactérias do ácido lático e os fungos filamentosos, foram responsáveis por inibir o desenvolvimento de patógenos nos queijos, principalmente, pela ação de ácidos orgânicos. Por meio da interação patógeno x microbiota do queijo, avalia-se que trinta dias de maturação é um prazo suficiente para diminuir o risco, mas não para reduzir completamente os microrganismos transmissores de doenças por alimentos.

Palavras-Chave: Interação microbiana; patógeno de origem alimentar; qPCR, mapas auto-organizáveis; compostos voláteis; ácidos orgânicos; Bactérias do ácido lático.

1 INTRODUÇÃO

A segurança alimentar é uma questão de suma importância, porque está relacionada ao desenvolvimento socioeconômico, e a presença de patógenos de origem alimentar, dos quais são causadores de doenças de transmissão hídrica e alimentar (DTHA) (FOX, Edward M. e colab., 2018). A presença desses microrganismos indesejáveis são um perigo contínuo para a saúde comunitária, afetando negativamente as economias dos países emergentes e subdesenvolvidos (WHO, 2023).

A cadeia do leite e de seus derivados, continuam sendo um desafio fundamental para a produção de alimentos seguros por causa do controle de bactérias patogênicas. Essa presença vem sendo relatada com frequência, principalmente em cadeias informais que contribuem para a carga global de DTHA (FOX, Edward M. e colab., 2018; LEDO e colab., 2019). Estima-se que a presença de patógenos foram responsáveis por 600 milhões de casos de doenças em todo o mundo, somente no ano de 2010 (HAVELAAR e colab., 2015).

Os queijos possuem um ambiente favorável para o desenvolvimento de patógenos, principalmente, pelo elevado pH e umidade (MELO e colab., 2015; SILVA e colab., 2023). A contaminação por patógenos está vinculada a fatores relacionados a produção dos queijos, incluindo a ordenha do leite até o produto final. Logo está correlacionada ao leite cru, a contaminação cruzada, os utensílios, os manipuladores e o contato com os ambientes de maturação (CAMPOS e colab., 2021; GLEESON e colab., 2013; KAMIMURA e colab., 2020; LEDO e colab., 2019).

A microrregião da Serra da Canastra é a mais antiga e tradicional, produtora de queijos minas artesanais. O tradicional processo de produção dos queijos da região da Canastra utiliza o leite de vaca cru, sem pasteurização, e cultura endógena denominada de “pingo”. O fato desse leite não passar por pasteurização é motivo de preocupação, por ser uma importante fonte de patógeno, como *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella* sp., *Staphylococcus* sp. e *Listeria monocytogenes* (PINTO e colab., 2009). Há uma controvérsia entre os pesquisadores quanto ao uso da matéria prima não tratada termicamente, onde uns demonstram que há segurança no seu uso (BEUVIER e BUCHIN, 2004) e outros defendem ser um perigo a saúde humana (KOUSTA e colab., 2010; SILVA e colab., 2023).

Para contornar o problema da contaminação por patógenos, a regulamentação brasileira exige que esses queijos da região da Canastra sejam comercializados somente após um período mínimo de maturação de 14 dias (EMATER., 2021). Entende-se que o período de maturação desempenha um papel muito importante na diversidade microbiana, características sensoriais e

físico-química dos queijos e diminuem o risco para o consumo humano (CAMPOS e colab., 2021; FUKA e colab., 2013). No entanto, diversos trabalhos, avaliaram que o período de maturação estabelecido pela legislação não é suficiente para eliminar os microrganismos deteriorantes e patogênicos, apesar de reduzirem a carga microbiana dos mesmos (CAMPAGNOLLO e colab., 2018; CAMPOS e colab., 2021; KAMIMURA e colab., 2020; NOGUEIRA VIÇOSA e colab., 2019; PINTO e colab., 2009; SILVA e colab., 2023; VALE e colab., 2018).

Neste contexto, diante de estudos que não exploraram o comportamento de patógenos de origem alimentar *in vitro* ou em produtos lácteos, o objetivo deste trabalho foi adequar o tempo de maturação para verificar a eliminação de *Staphylococcus aureus* e *Listeria monocytogenes* de queijos minas artesanais da região da Canastra durante trinta dias. Análises de qualidade, físico-químicas, microbiológicas e moleculares, também foram realizadas durante o processo de maturação.

2 MATERIAL E MÉTODOS

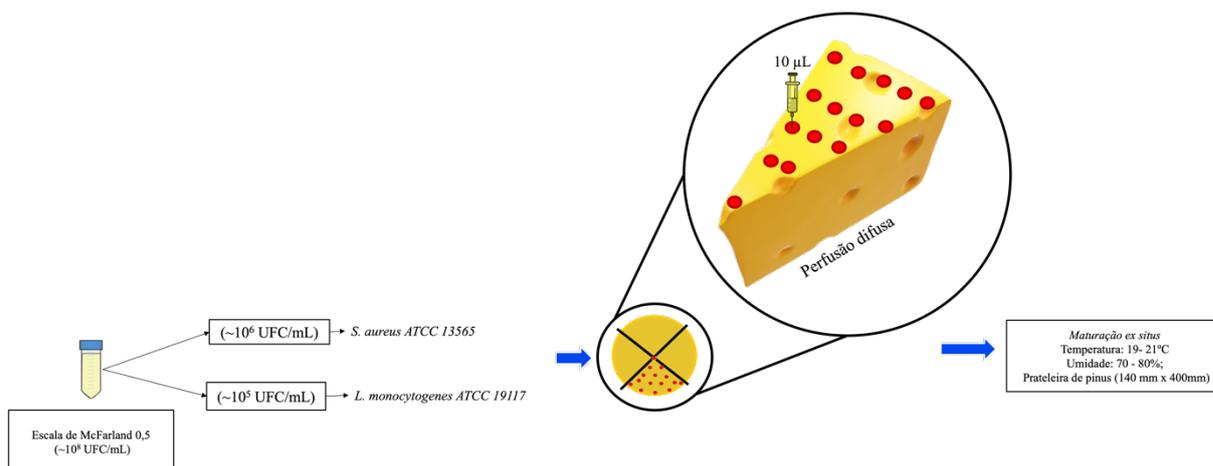
2.1 Amostragem, microrganismos e padronização de inóculo

Produtos acabados de aproximadamente 1,2 kg foram adquiridos na região da canastra do estado de Minas Gerais, em fazendas localizadas em Bambuí (20° 1' 17" S, 45° 57' 39" O, 725 m) (n=14) e Tapiraí (19° 53'16" S, 46° 01' 13" O, 673 metros) (n=14). Os queijos foram refrigerados e transportados ao laboratório. O tempo desde a coleta da amostra até a análise foi de 24 horas.

Culturas estoques de *Staphylococcus aureus* ATCC 13565 e *Listeria monocytogenes* ATCC19117 mantidas em meio de congelamento (Glicerol - 15 mL; peptona bacteriológica - 0,5 g; extrato de levedura - 0,3 g; NaCl - 0,5 g; água destilada 100 mL) foram usadas para o desenvolvimento do trabalho. As cepas foram reativadas transferindo-se alíquotas de 1 mL das culturas estoque para tubos contendo 5 mL de caldo BHI (*Brain Heart Infusion*), as quais foram incubadas a 37°C por 24 h. Dessa maneira, os inóculos foram centrifugados à 10000 g por 5 minutos à 4 °C, de forma que a células foram ressuspensas em solução salina 0,85% e padronizadas na escala de McFarland á 0,5 (8 log UFC/mL). O inóculo das cepas de *S. aureus* e *L. monocytogenes* foram diluídas para 6 log UFC/mL e 4 log UFC/mL, respectivamente. A inoculação foi realizada através da setorização do queijo em quarto partes, ao qual foram

realizadas quatorze perfusões e foram inoculados 10 µL da suspensão bacteriana padronizada difusamente, totalizando 140 µL por setor, proporcional ao peso nos queijos (Figura 1).

Figura 1 - Inoculação de microrganismos de origem alimentar para maturação *ex situ* de queijos minas artesanais da microrregião da Canastra.



Fonte: Do autor (2023).

A maturação *ex situ* dos queijos foi realizada em sala de maturação, com temperatura variando entre 19 - 21°C, e umidade relativa variando entre 70-80%, executada em prateleiras de madeira pinus (140 mm x 400mm), durante 30 dias. A amostragem para análises físico-químicas e microbiológicas foram realizadas a cada 5 dias, o qual o queijo foi fracionado e ralado, com auxílio de ralador manual. Os QMA-MC foram dispostos em prateleiras de madeira pinus não tratada (140 mm x 400mm), de forma que as mesmas passaram por revezamento de sua posição na sala, bem como foi realizada a viragem dos queijos diariamente. A maturação foi dividida em quatro tratamentos e passam a ser nomeado por queijos minas artesanais da região da canastra (QMA) produzidos em Bambuí e inoculado com *S. aureus* (QMA-BS), os produzidos em Tapiraí e inoculado com *S. aureus* (QMA-TS), os produzidos em Bambuí e inoculado com *L. monocytogenes* (QMA-BL) e os produzidos em Tapiraí e inoculado com *L. monocytogenes* (QMA-TL). Todos os experimentos foram realizados em triplicata.

2.2 Quantificação de grupos microbianos por meio diferencial-seletivo

Os diferentes tratamentos foram homogeneizados, separadamente, em citrato de sódio 2% (p/v) (1:9), em Stomacher (490 golpes/min) por 5 minutos. Quatro diferentes meios de cultura foram usados para estudar as comunidades microbianas, de forma que a contagem das

populações foi realizada a cada cinco dias até o trigésimo dia da maturação. Ágar Man, Rogosa e Sharpe (MRS), suplementado com nistatina 0,25% (v/v) foi utilizado para população de bactérias do ácido láctico (BAL), e as placas incubadas a 32 ± 1 °C por 48 horas em anaerobiose, utilizando geradores de anaerobiose (Anaerobac, Probac do Brasil®, São Paulo, Brasil) (NJONGMETA e colab., 2015); Ágar tripticase de soja (TSA) suplementado com nistatina 0,25% (v/v) para a contagem total de aeróbios mesófilos e as placas forma incubadas a 37 ± 2 °C por 24 horas (RYSER e SCHUMAN, 2015); Ágar YEPG (Extrato de levedura: 10g; Peptona bacteriológica: 20g; Glicose: 20g; Ágar 15g/ 1 litro de água destilada) suplementado com cloranfenicol 0,1% (p/v). Incubou-se as placas semeadas em superfície à 30 ± 2 °C por 72 horas, para contagem de fungos filamentosos e leveduras (RYU e WOLF-HALL, 2015). Todas as contagens de microrganismos foram expressas em unidades formadoras de colônia por grama de queijo (log UFC/g).

2.3 Monitoramento dos inóculos e perfil microbiano

2.3.1 Extração de DNA genômico

As extrações do DNA total para avaliação molecular foram realizadas, apenas, nos tempos 0, 10, 15, 20 e 30 dias de maturação. Cinco gramas de cada tratamento. Foi adicionado 45 mL de citrato de sódio 2% (p/v) à 45 °C e homogeneizados em Stomacher Metroterm® (260 golpes/min) por 5 min. Quinze mililitros do sobrenadante foi centrifugado à 10000 g/ 10 min/ 25°C. Camadas de gordura foram retiradas com auxílio de *swabs* estéreis e o sobrenadante foi descartado. Para lavagem e ressuspensão do pellet, foi adicionado 1 mL de citrato de sódio 2% (p/v) e em seguida centrifugado 10000 g/ 10 min/ 25°C. Esse procedimento foi realizado quatro vezes até que não houvesse mais gordura no tubo. O pellet resultante foi usado para extração de DNA. O kit Invitrogen PureLink Microbial DNA Purification foi utilizado para a extração de DNA (Invitrogen Canada Inc., Burlington, ON, Canadá), utilizando o protocolo para cultura microbiana e amostras de meios de transporte (BARZIDEH e colab., 2022). O DNA das cepas puras de *S. aureus* ATCC 13565 e *L. monocytogenes* ATCC19117 também foram extraídos nas mesmas condições.

2.3.2 Reação em Cadeia da Polimerase em tempo real (qPCR)

O monitoramento das populações de bactérias patogênicas foi realizado até o final da maturação por qPCR utilizando o sistema Rotor-Gene Q (Qiagen, Hombrechtikon, ZH, Suíça). Cada reação compreendeu 10 µL de Rotor-Gene SYBR Green PCR (Qiagen, Stockach Konstanz, Alemanha), 2 µL (12,5 µM) de cada iniciador (Invitrogen, São Paulo, SP, Brasil) e 1 µL de DNA extraído de os grãos de café para um volume total de 20 µL. A mistura foi aquecida a 95 °C por 2 min, seguida de 40 ciclos de desnaturação 95 °C por 5 s e recozimento/extensão a 60 °C por 10 s. A temperatura do ciclo foi aumentada em 1 °C a cada 5 segundos de 50 °C a 99 °C para obter a curva de fusão. Para a curva padrão as bactérias patogênicas foram cultivadas, separadamente, em meio TSA a 37 °C, até atingirem a população de 8 log UFC/mL, a população foi estimada usando plaqueamento e técnica de microgota. O DNA foi extraído como descrito e então diluído em série (1:10) de 10⁸ para 10³ células/mL até 10 células/mL (BATISTA e colab., 2015). Os primers específicos para os genes sea, para detecção de *S. aureus*, e para o gene hlyA, para detecção de *L. monocytogenes*, foram utilizados e seus parâmetros podem ser observados na tabela suplementar S1 (NOGUEIRA VIÇOSA e colab., 2019; WEI e colab., 2019). A especificidade de cada par de primers foi confirmada por pesquisa no GenBank usando o BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>).

2.3.3 Amplificação por PCR

O DNA da comunidade bacteriana foi amplificado com os primers 338fgc (5'-CGCCCGCCGCGCGCGGGCGGGGCGGGGGCACGGGGGGACTCCTACGGGAGGCGCAG-3') (o grampo GC está sublinhado) e 518r (5'-ATTACCGCGGCTGCTGG-3'), que tem como alvo a região V3 do gene 16S rRNA. Já para a comunidade eucariótica foi amplificado com os primers NS3 (5'-GCAAGTCTGGTGCCAGCAGCCCGCCCGCCGCGCGCGGGCGGGGCGGGGGCACGGGGGG-3') (o grampo GC está sublinhado) e YM951r, (5'-TTGGCAAATGCTTTTCGC3-') que tem como alvo um fragmento do gene 18S rRNA. A PCR foi realizada em um volume final reação de 20 µL, contendo: 12,5 µL de tampão MasterTaq (MasterTaq master mix, Qiagen, Hilden, Alemanha), 0,5 µM de primer, 1 µL de DNA extraído e 5,5 µL de água ultrapura livre de DNA/RNA. Para os primers de eucarioto, foi utilizado um programa onde o DNA molde foi desnaturado por 5 min a 95 °C, seguido por 30 ciclos, depois desnaturado a 92 °C por 1 min e anelado a 55 °C por 1 min, e a extensão do primer foi realizada a 72 °C por 1 minutos, seguido por uma etapa de alongamento de 72 °C por 7 minutos (RAMOS e colab., 2010). Já para os primers de procariotos o DNA foi desnaturado por 3 min a 94 °C, seguido por

34 ciclos, depois desnaturado a 94 °C por 1 min e anelado a 55 °C por 1 min, e a extensão do primer foi realizada a 72 °C por 1 minutos, seguido por uma etapa de alongamento de 72 °C por 10 minutos. Alíquotas dos produtos da amplificação foram analisadas para atestar a qualidade do DNA com gel de agarose 0,8% e as amostras foram armazenadas a -20 °C até análises de PCR-DGGE.

2.3.3 PCR-DGGE e Identificação de espécies

Os produtos de PCR foram analisados por eletroforese em gel de gradiente desnaturante (DGGE) usando um BioRad DCode Universal Mutation Detection System (BioRad, Richmond, CA, EUA). Os amplicons de PCR convencional, foram separados por DGGE em gel de poliacrilamida à 8% com gradiente de desnaturação de 30 a 60%, para verificar a comunidade de procariotos e eucariotos. As corridas de gel foram realizadas por 4 h a 200 V a 60 °C. Em seguida, os géis foram corados com SYBRGreen I (Molecular Probes, Eugene, Reino Unido) durante 30 min (DEMIRCI e colab., 2021; RYCHLIK e colab., 2017). A visualização do gel foi realizada em transiluminador.

Após visualizar os géis, as bandas selecionadas foram excisadas e eluidas em 20 µL de água ultrapura à 4 °C durante a noite. Assim, foram reamplificadas com os primers 518r, para eucariotos, e YM951r, para procariotos. Os produtos foram sequenciados e identificados por comparação com sequencias semelhantes disponíveis no banco de dados Genbank (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>).

2.4 Análises Químicas

2.4.1 pH e acidez titulável total

Foram determinados o potencial hidrogeniônico (TEC5, Tecnal, Piracicaba, São Paulo, Brasil) e acidez titulável total (ATT), ao qual foi expressa em g.100g⁻¹ de ácido láctico ao longo dos trinta dias de maturação (AOAC, 2016).

2.4.2 Ácidos orgânicos e carboidratos

As concentrações de ácido cítrico, tartárico, málico, succinico, láctico, acético, propiônico, butírico e isovalérico e lactose foram determinadas. A extração dos ácidos

orgânicos e carboidratos foi realizada segundo metodologia descrita por Andrade et al. (2019). A análise cromatográfica foi realizada utilizando sistema Shimadzu (model LC-10 Ai, Shimadzu Corp. Kyoto, Japão) equipado com detectores Ultra Violet detector (UV) e Refractive Index Detector (RI -10A). A coluna cromatográfica Shimpack SCR-101H (7.9 mm × 30 cm) operada a 30 °C para a lactose, onde foi detectada via RI-10A, e 50 °C para ácidos orgânicos, onde foi detectado por meio de absorvância UV (210 nm). A eluição ocorreu por meio de solução de ácido perclórico a 16nM (pH 2.1) a uma taxa de fluxo de 0,6 mL/min. A identificação do composto foi realizada comparando os tempos de retenção dos picos das amostras experimentais com os tempos de retenção dos padrões de referência injetados sob as mesmas condições. A quantificação foi realizada usando curvas de calibração externas. As análises foram realizadas em triplicata e expressas em mg. g⁻¹ de queijo (PUERARI e colab., 2012).

2.4.3 Compostos voláteis por cromatografia gasosa (GC-MS)

A microextração automática em fase sólida (SPME) de compostos voláteis foi realizada utilizando 3 g dos diferentes tratamentos de QMA ralado, adicionado 4-nonanol (125 mg/L), como padrão interno (ANDRADE e colab., 2019). As amostras foram colocadas em frascos de 15 mL e a extração de compostos voláteis livres foi realizada com fibra 50/30 µm DVB/CAR/PDMS por 45 minutos a 60 °C. A fibra foi mantida no injetor, no modo splitless, por 3 min, para dessorção de compostos voláteis. As análises foram realizadas em GC-MS QP2010SE (Shimadzu Corp. Kyoto, Japão) equipado com coluna Carbo-Wax 20 M (30 m × 0.25 mm × 0.25 mm) mantida a 40°C, aumento de 4°C/min até 120°C, aumento de 6°C/min até 240°C e então mantido por 12 min a 240°C. A temperatura do injetor e do detector foi de 250 °C e o gás de arraste (He) foi usado em um fluxo de 1,0 ml.min⁻¹. Os espectros de massa detectados foram comparados com o banco de dados NIST11, e uma série de alcanos (C10-C40) foi usada para calcular o índice de retenção (RI). A porcentagem relativa dos compostos foi calculada pela normalização da área do pico (JIA e colab., 2021a).

2.5 Análises estatísticas

Um delineamento inteiramente casualizado (DIC) em esquema fatorial foi utilizado dos quais os fatores eram: 2 produtores (Bambuú e Tapirai) x 7 tempos de maturação (0, 5, 10, 15,

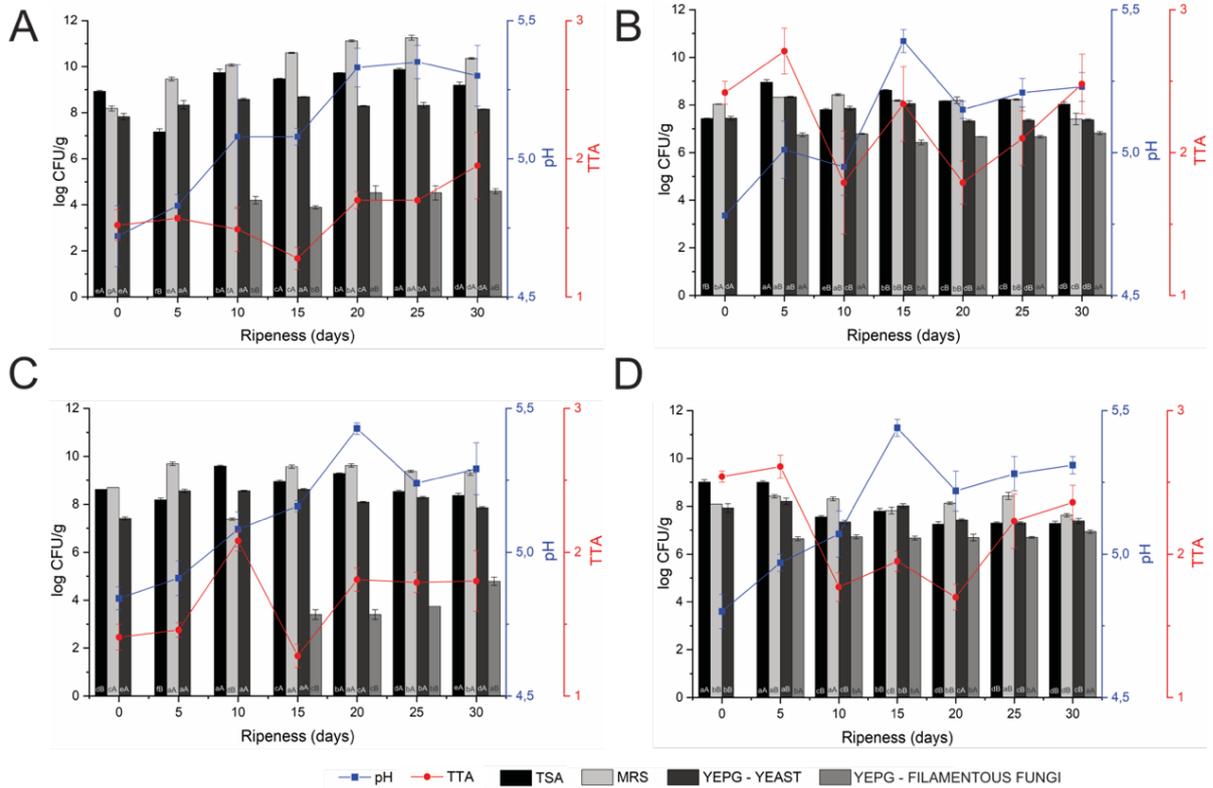
20, 25, 30). Os resultados foram expressos em média \pm desvio padrão, o qual foi aplicada análise de variância (ANOVA) para os parâmetros físico-químicos e microbiológicas, seguido de teste Scott-Knott ($p < 0.05$) entre os tempos de maturação e um teste de t-Student, entre os produtores. Considerou-se estatisticamente significativo o valor de $p < 0.05$. Os métodos estatísticos multivariados, mapa auto-organizáveis (SOM) e as correlações de Pearson foram aplicados para comparar os resultados obtidos durante a maturação de 30 dias. Todas as análises estatísticas foram realizadas no software R (4.0.2, pacotes FactoMineR e factoextra).

3 RESULTADOS

3.1 População de grupos microbianos e detecção de patógenos por qPCR

Houve uma diferença estatística no perfil da população dos grupos microbianos entre os diferentes tratamentos avaliados pela contagem em placa utilizando meio seletivo (Figura 2), bem como entre os queijos produzidos em diferentes fazendas.

Figura 2 - Alterações microbianas (log UFC/g) de queijos minas artesanais produzidos em fazendas da região da Canastra durante a maturação. A) Queijo inoculado com *Staphylococcus aureus* produzido em Bambuí (QMA-BS). B) Queijo inoculado com *Staphylococcus aureus* produzido em Tapiraí (QMA-TS). C) Queijo inoculado com *Listeria monocytogenes* produzido em Bambuí (QMA-BL). D) Queijo inoculado com *Listeria monocytogenes* produzido em Tapiraí (QMA-TL).¹



¹As letras minúsculas mostram diferença significativa pelo teste de Scott-knott com $p < 0,05$ e as letras maiúsculas mostram diferença estatística pelo teste T com $p < 0,05$.

Fonte: Do autor (2023).

De maneira geral, houve variação na população dos grupos microbianos ao longo do tempo. A população do aeróbios mesófilos se comportou diferente em cada tratamento. Para os QMA-S, houve um aumento da população quando observamos a diferença entre o início e o final da maturação (QMA-BL – 3,02%; QMA-TS – 8,20%). Comportamento contrário foi observado para os queijos inoculados com *L. monocytogenes* (QMA-BL – 3,0%; QMA-TL – 19,2%).

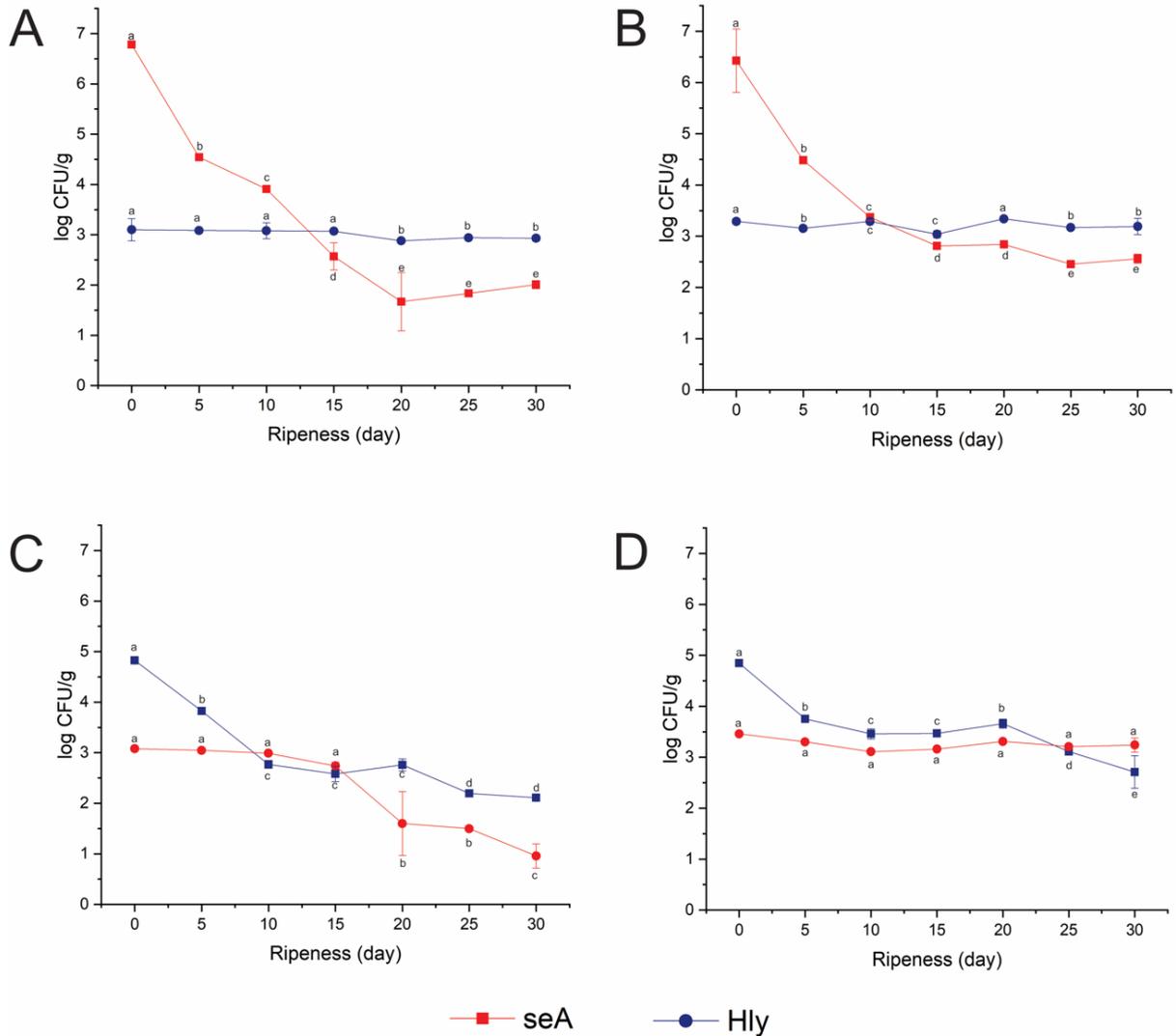
Quanto a população de BAL, foi observado aumento da população, principalmente no QMA-BL e QMA-TL, quando comparado o T0 e o T30, em cerca de 27% e 7 %, respectivamente. A premissa não foi a mesma para os QMA-T, o qual a sua população reduziu em média 7,38% ao longo do tempo.

O outro grupo microbiano avaliado, as leveduras, tiveram sua população crescente nos primeiros cinco dias de maturação para todos os tratamentos, e comportamentos diferentes quando observados os outros dias de maturação. Os QMA-B tiveram a população crescente ao final da maturação quando comparado ao T0, como 4 e 6 %, para os QMA-BL e QMA-TL, respectivamente, equivalendo ao aumento de 1 log.

Diferentemente disso, a população dos fungos filamentosos foi expressiva após o quinto dia, para os queijos QMA- TS (6,75 log UFC.g⁻¹) e QMA-TL (6,64 log UFC.g⁻¹), após o decimo dia para o QMA-BS (4,20 log UFC.g⁻¹) e após o decimo quinto dia para o QMA-BL (3,40 log UFC.g⁻¹).

Além disso, a técnica de qPCR, possibilitou o acompanhamento da população ao longo da maturação dos patógenos inoculados (Figura 2 e Figura 3). A detecção do gene sea, foi realizada para avaliar a presença de *S. aureus*. Houve diferença estatística entre o T0 e o T30, havendo uma redução da população em 70,35% (T0: 6,79 log UFC.g⁻¹; T30: 2,01 log UFC.g⁻¹) e 56,22% (T0: 6,42 log UFC.g⁻¹; T30: 2,56 log UFC.g⁻¹), para QMA-BS e QMA-TS, respectivamente. A presença de *L. monocytogenes* foi detectado, em que houve redução da sua população em cerca de 5% apenas em QMA-BS.

Figura 3 - Monitoramento de bactérias patogênicas de origem alimentar por qPCR. A) Detecção de *Staphylococcus aureus* pelo gene sea e *Listeria monocytogenes* pelo gene hlyA em QMA produzida em uma fazenda em Bambuí. B) Detecção de *Staphylococcus aureus* pelo gene sea e *Listeria monocytogenes* pelo gene hlyA em QMA-MC produzido em uma fazenda em Tapiraí. C) Detecção de *Staphylococcus aureus* pelo gene sea e *Listeria monocytogenes* pelo gene hlyA em QMA produzido em uma fazenda em Bambuí. D) Detecção de *Staphylococcus aureus* pelo gene sea e *Listeria monocytogenes* pelo gene hlyA em QMA-MC produzido em uma fazenda em Tapiraí.



Fonte: Do autor (2023).

Quanto a detecção do gene *hlyA*, foi realizada para avaliar a presença de *L. monocytogenes*. Houve diferença estatística, havendo uma redução de 56,22% (T0: 4,82 log UFC.g⁻¹; T30: 2,11 log UFC.g⁻¹) e 44% (T0: 4,84 log UFC.g⁻¹; T30: 2,71 log UFC.g⁻¹), para QMA-BL e QMA-TL, respectivamente. Além disso, foi realizada a pesquisa de *Staphylococcus* produtores de enterotoxinas A nesses queijos, como forma de avaliar a qualidade. Houve uma redução da população ao longo do tempo, nos QMA-BL, em cerca de 69%, enquanto no QMA-TL não variou a população quando observado o período da maturação.

3.3 Avaliação dos parâmetros físico-químicos e bioquímicos por SOM

A partir da *U-matrix* (Figura 4A), podemos visualizar a formação de grupos com características semelhantes com base na distância entre os neurônios, dos quais quanto mais

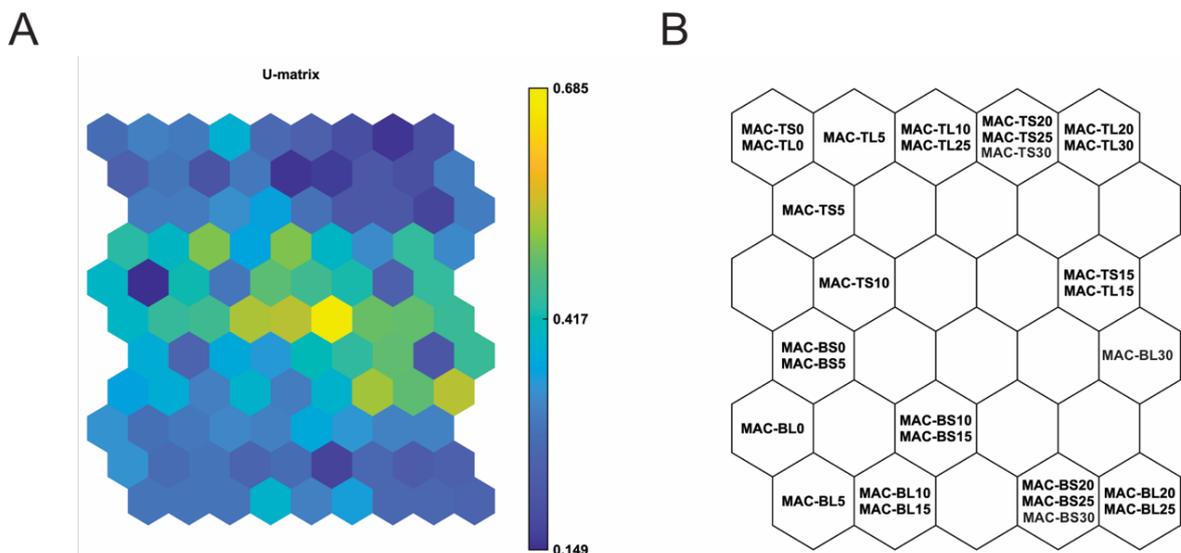
escuro o tom de azul, maior a proximidade entre as amostras e quanto mais escuro o tom de amarelo, maior a distância. A matriz U indica a possibilidade de haver dois grupos separados: um no topo e outro na base da matrix, separados pela faixa amarela no meio.

Para avaliar as mudanças físico-químicas e bioquímicas dos QMA, foi utilizado os mapas auto-organizáveis realizados através de redes neurais artificiais (ANN), e as variações podem ser observadas através da *U-matrix* (Figura 4A). Esse tipo de estatística multivariada possibilita visualizar as singularidades dos diferentes tratamentos propostos por esse estudo. Assim, através da distancias dos neurônios, de forma que quanto mais escuro o tom de azul, maior a proximidade entre as amostras e quanto mais escuro o tom de amarelo, maior a distância.

A figura 4 apresenta os planos componentes mostrando as concentrações das variáveis estudadas. A barra de cor ao lado de cada mapa permite visualizar a distância entre os neurônios assim como na *U-matrix*. Assim, podemos inferir que os queijos inoculados e produzidos em fazendas de Bambuí e Tapiraí foram separados por apresentar valores bem diferentes entre si pelas variáveis estudadas. Isto pode ser observado pela variação da escala de cor que ocorre verticalmente (Figura 4B).

Figure 4 - Avaliação de variáveis físico-químicas e microbiológicas por rede neural artificial.

A) *U-Matrix* dos 25 componentes processados. B) Distribuição dos tempos de maturação (0, 5, 10, 15, 20, 25, 30 dias) dos queijos minas artesanais produzidos em fazendas da região da Canastra inoculados com *Staphylococcus aureus* (QMA-S) e *Listeria monocytogenes* (QMA-L) no SOM.

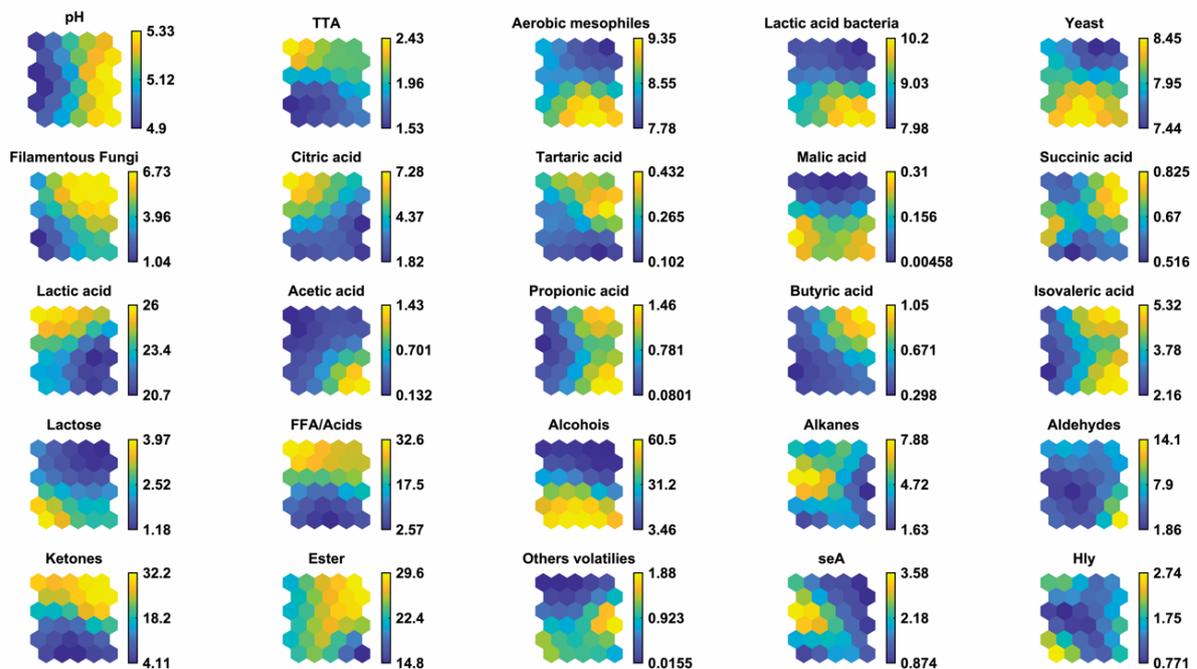


Fonte: Do autor (2023).

3.3.1 ph e Acidez titulável total

O presente estudo observou diferença significativa do pH e a acidez titulável total (TTA) e o período de maturação das amostras de QMA (Figura 1 e Figura 5). Houve um aumento do pH ao longo da maturação em todos os tratamentos avaliados. Os queijos produzidos em diferentes fazendas queijeiras tiveram seus pH modificados a partir do dia 10, para QMA-L e dia 20, para QMA-S, de forma que seus valores se mostraram acrescidos ao longo do tempo. Ao contrário do pH, a TTA foram diminuindo de forma que os queijos possuíam uma alta acidez ao final do período de maturação, em adição a isso, o QMA-TL, foram considerados mais ácidos, variando de 2,54- 2,36% de ácido lático.

Figure 5 - Componentes do SOM para 25 variáveis de entrada. Os mapas são combinados como variáveis e são comparados com a distribuição dos grupos representados na Figura 4B. As cores indicam o valor do componente no vetor de peso de cada unidade no mapa, de acordo com as barras coloridas no lado direito.



Fonte: Do autor (2023).

3.3.2 Ácido orgânicos e carboidratos

Os ácidos orgânicos e os carboidratos foram medidos a partir dos queijos inoculados durante a maturação (Figura 4). Suas concentrações podem ser observadas na tabela suplementar S2 e S3. De maneira geral, foi observado diferenças entre os queijos produzidos em Bambuí e Tapiraí ($p < 0,05$). Os queijos possuíam concentração de ácido cítrico e lactose de 2,13 mg. g⁻¹ e 6,38 mg. g⁻¹, para QMA-BL, 5,76 mg. g⁻¹ e 3,75 mg. g⁻¹, para QMA-BS, o qual houve uma redução de 100 % e 53,60%, e 48,61% e 43,20% ao final da maturação, respectivamente. Além disso, esses compostos dos QMA-BL foram consumidos logo nas primeiras 120 horas de maturação (T5). Comportamento parecido foi observado nos tratamentos QMA-TL e QMA-TS, onde uma redução das concentrações foi observada entre o tempo inicial e final, em cerca de 50% e 68%, e 31% e 32%, respectivamente.

Com o consumo dessas fontes de carbono, importantes ácidos foram gerados a partir do metabolismo dos microrganismos presentes. O ácido acético foi metabolizado apenas nos queijos produzidos em Bambuí, independente da inoculação, de forma que houve um aumento de 8 e 15x do tempo zero para o tempo trinta de maturação, para os QMA-BS e QMA-BL, respectivamente. Além disso, também foram produzidos ácido propiônico, de forma que nos QMA-BS e QMA-TS, foi possível detectá-lo somente após o 10º dia, e a partir daí a sua concentração foi aumentando significativamente. Esse comportamento também observado para o ácido butírico, dos quais atingiram concentrações expressivas apenas para os QMA-T, com valores de 0,98 mg. g⁻¹ e 3,69 mg. g⁻¹, com acréscimo 3 e 12x maiores que no início do processo de maturação, para os QMA-TS e QMA-TL, respectivamente.

Quanto ao ácido isovalérico, um importante ácido volátil para o desenvolvimento de sabor em queijos, teve a sua concentração aumentada significativamente durante a maturação para todos os tratamentos, aumentando em taxa maiores que 100%.

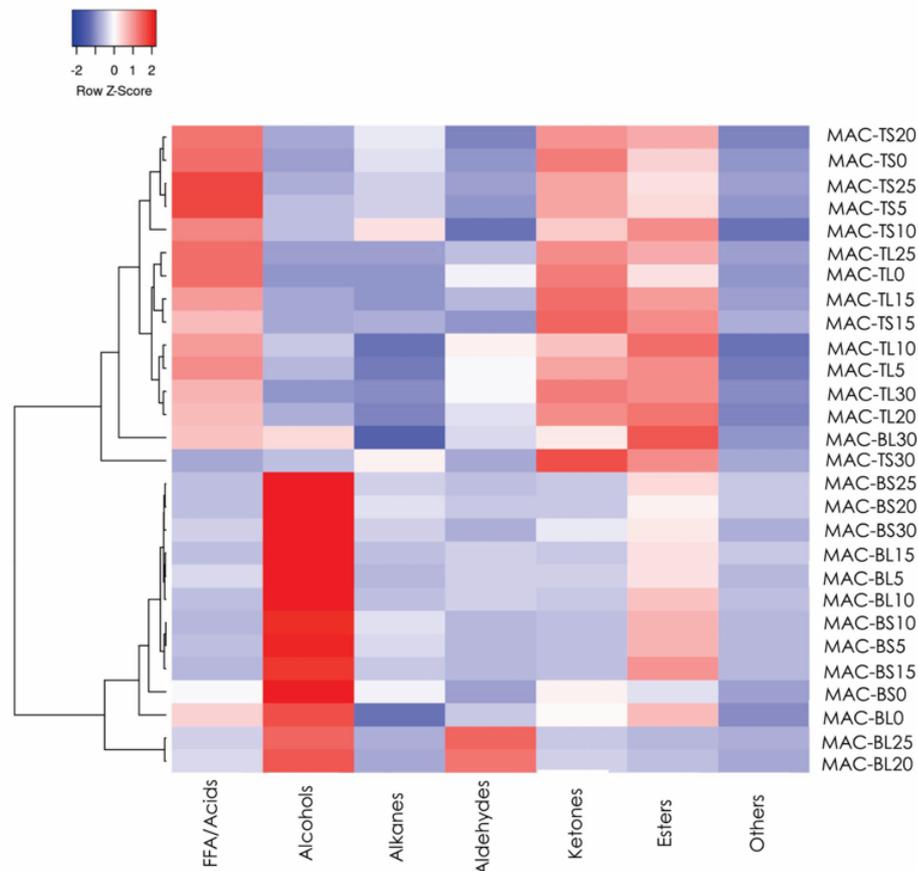
3.3.3 Compostos voláteis

A abundância relativa média dos compostos voláteis individuais identificados durante o período de maturação pode ser observada nas tabelas suplementares S5 e S6. Foram identificados no total de 66 compostos para os queijos produzidos em Bambuí e 63 para os de Tapiraí, que puderam ser agrupados e de acordo com sua estrutura química, nomeadamente de FFA/ácido, álcoois, alcanos, aldeídos, cetonas, ésteres e outros voláteis.

O perfil de voláteis para os queijos de Bambuí e Tapiraí se mostraram diferentes. A predominância de álcoois e éster foi observada em QMA-B, de forma que o álcool feniletílico

e acetato de fenetila estiveram presentes nos queijos inoculados. Já as classes FFA/ácido, cetonas e ésteres estão em abundância nos QMA-T, de forma que isobutírico anidrido, 4-hexadecanona, acetato de fenetila e ácido hexanoico, 1,1-dimetilpropil ester foram predominantes em QMA-TS e QMA-TL. Além disso, alguns compostos voláteis, menos predominantes estiveram presentes exclusivamente nos tratamentos, como por exemplo o álcool, 3-metil-1-butanol, que esteve presente apenas no QMA-BS, e o éster etílico do ácido cáprico esteve presente no QMA-TL e QMA-BL, de maneira a conferir diferenças no sabor a aroma dos queijos.

Figura 6 - Mapa de calor de grupos de compostos voláteis e agrupamento de tempos de maturação (0, 5, 10, 15, 20, 25, 30 dias) de queijos minas artesanais produzidos na região da Canastra inoculados com *Staphylococcus aureus* (QMA-S) e *Listeria monocytogenes* (QMA-L) (Tabela S5 e S6).



Fonte: Do autor (2023).

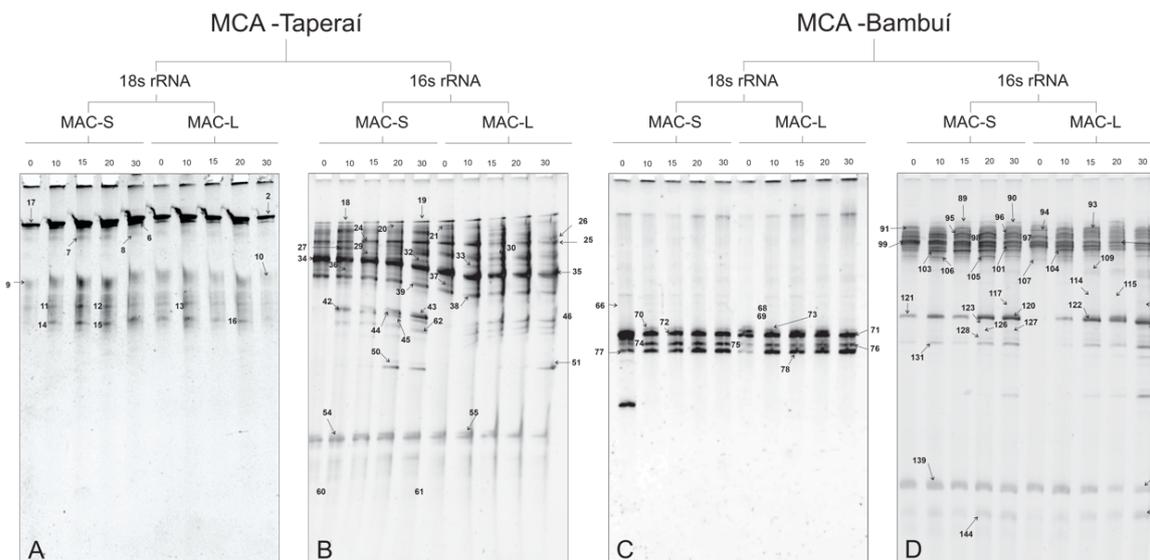
Com todas essas diferenças, foi possível observar que o perfil volátil ao longo da maturação foi modificado pela presença de *S. aureus*, mas não de *L. monocytogenes*. O *Staphylococcus aureus* auxiliou na produção de voláteis não predominantes, como as cetonas, alcanos e ácidos graxos de cadeia livre, no início do processo de maturação (T0 e T5), em QMA-BS.

3.4 Impressão digital por PCR-DGGE

Para determinar a diversidade microbiana dos queijos inoculados foi empregada a análise de PCR-DGGE (7). A identificação dos microrganismos pelo método independente de cultivo com o sequenciamento de fragmentos do gene 18S rRNA e da região V3 do gene 16S rRNA, podem ser observados na Tabela suplementar S4. A predominância de um perfil diferente entre as fazendas queijeiras foi observado de forma que a *Kluyveromyces lactis* (CP042458.2), foi dominante em todo o processo de maturação dos QMA-TS e QMA-TL, evidenciado pelas bandas 2, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 13, 14, 15, 16 e 17. Além disso foi identificado no T20 de QMA-TS, a presença do gênero *Candida* sp. (87,36%; MH545921.1).

Para os QMA-BS e QMA-BL, foi observada predominância com bandas intensas em todo o processo de maturação de *Kluyveromyces lactis* (Bandas: 70, 71e 72; 98,61%; CP042458.2) e *Diutina catenulata* (Bandas: 69,76, 77 e 78; 98,85%; MK394156.2), o qual para esse ultimo microrganismos, com o desenvolvimento do processo de maturação as bandas foram ficando mais intensas logo após o decimo dia para o QMA-BL. Ainda foram identificadas bandas atribuídas ao gênero *Diutina* (Bandas:66, 68, 74, 75; MK394156.2) no T0 e T10, além da presença de microrganismos do gênero *Meyerozyma* (Banda: 73; KM222231.1).

Figura 7 - Perfil microbiano de DGGE de queijos inoculados. A) Perfil de DGGE do fragmento do gene 18s rRNA da região da canastra produzido em uma fazenda em Tapiraí. (B) Perfil de DGGE da região V3 - 16s rRNA da região da canastra produzida em uma fazenda em Tapiraí. (C) Perfil de DGGE do fragmento do gene 18s rRNA da região da canastra produzido em uma fazenda em Bambuí. (D) Perfil de DGGE da região V3 - 16s rRNA da região da canastra produzida em uma fazenda em Bambuí.



Fonte: Do autor (2023).

Para estudar a diversidade de procariotos nos queijos, a região V3 do gene 16S rRNA foi amplificada. Dessa maneira, observou-se que *Lactococcus lactis* subespécie *lactis* (Bandas: 21, 24, 25, 26, 30, 33, 34, 36, 37, 38, 39, 54, 55, 60; >93%) foi a bactéria predominante no processo de maturação dos queijos inoculados. Ainda foram identificadas bandas de *Lactococcus* sp. (Bandas: 19, 20, 61, <90%) em diferentes tempos da maturação, sendo a banda 20, identificada no tempo 20, a 19 identificada no tempo 30 do QMA-TS e a banda 61 no início da maturação. Outras BALs também foram identificadas no QMA-T, onde a banda 18, representa *Lactococcus garvieae* (96,34%; OP420803.1), identificada no T10. A banda 45, presente no QMA-TS, no tempo 20, representa *Lentilactobacillus hilgardii* (90,99%; CP050262.1). Nesse mesmo tratamento foi observada a presença de *Streptococcus ferus* (Bandas: 27, 32; 94,55%; LS483343.1) nos tempos T10 e T30. Outras espécies de bactérias se mostraram presentes, como a *Corynebacterium variable* (Bandas: 42, 43, 44, 46), nos tempos 0, 20 e 30, nos QMA-TS, e no tempo 30, nos QMA-TL. Ainda foi identificada *Corynebacterium* sp. relacionada pela banda 62. Além dessas, a *Brevibacterium sediminis* (Bandas: 50, 51; >95%, MN918417.1), se mostraram presentes a partir do tempo 20, no QMA-TS, e apenas no tempo 30 dos QMA-TL.

Embora a análise de DGGE tenha atestado a diferença no perfil dos queijos inoculados e das fazendas queijeiras, microrganismos em comum foram encontrados nos tratamentos. A *Lactococcus lactis* (97,47%; OP714092.1) e *Lactococcus* sp. (88,12%; OP901763.1), foram identificadas pela banda 109 e 107, respectivamente, nos tempos 0 e 15, apenas nos QMA-BL.

Diferentemente nos queijos produzidos em Tapiraí, a *Corynebacterium variable* (Bandas: 115, 116, 117, 120, 121, 122, 123, 124, 125, 127, 130, 131, 141; >92%; MT573863.1),

demonstrou ser predominante na maturação dos queijos produzidos em Bambuí, e observou-se diferenças entre os queijos inoculados, de forma que nos QMA-BS, esse microrganismo esteve presente em todos os trinta dias de maturação, enquanto no QMA-BL, apareceu apenas após o 10º dia. Outro microrganismo que também foi predominante, foi o *Staphylococcus saprophyticus* (Bandas: 89, 90, 95, 98, 99, 104; >92%), presente em todos os dias no QMA-BS e QMA-BL, principalmente, após o 10º dia de maturação.

Além disso, outros microrganismos foram identificados em QMA-BL, *Staphylococcus gallinarum* (Banda: 93; 99,13%; OQ606811.1), no dia 15, *Halanaerobacter* sp. não cultivável (Banda: 97; 86,67%), no tempo 0 e *Chloroflexota* não cultivável (Banda: 114; 93,33%), no T15, *Tricococcus* sp. não cultivável (Banda: 146; 88,78%), no tempo 30. *Latilactococcus curvatus* (Banda: 93; 99,13%; OQ606811.1), presente no dia 10, *Staphylococcus* sp. não cultivável (Banda: 96; 96,36%), no tempo 30, e no tempo 20, *Actinomycetales* não cultivável (Banda: 126; 97,74%) foram identificados em QMA-BS. A presença de *Bacillus* sp. (Bandas: 94, 101, 106; <85%) e *Proteobacterium* não cultivável, (Banda: 128, 129; 100%, GU219959.1, GU219959.2), foram observados nos queijos de Bambuí. Dessa maneira, os resultados da PCR–DGGE correlacionaram-se bem com o método dependente de cultivo.

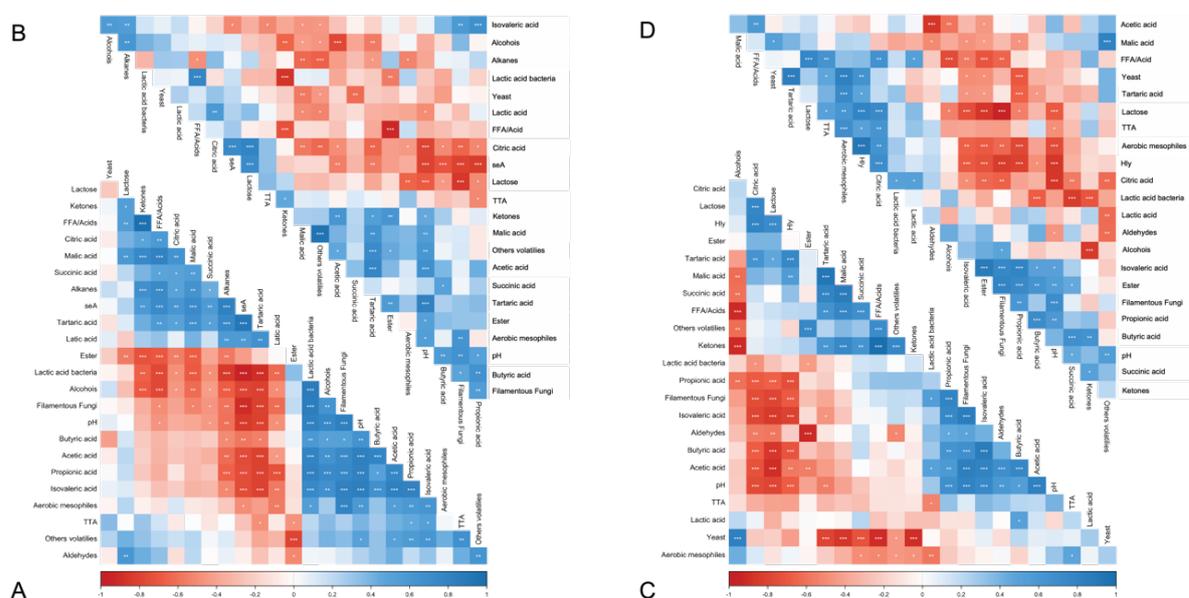
3.6 Correlação entre os grupos microbianos, parâmetros físico-químicos e compostos bioquímicos

A correlação dos parâmetros físico-químicos, microbiológicos e os compostos bioquímicos são apresentados na Figura 8. De maneira geral, correlações positivas e negativas foram significativas, indicando que as variáveis estudadas dos queijos inoculados, influenciaram no processo de maturação devido a singularidade de cada queijo e influenciaram, principalmente, na sua inocuidade.

A correlação do queijos inoculados com *S. aureus*, podem ser observados na figura 8A e 8B. Foi observada correlação positiva de moderada a forte, entre as bactérias lácticas e os fungos filamentosos (0,83), bem como os aeróbios mesófilos (0,54). Além disso, a presença de grupos voláteis predominante, estão correlacionados as BALs, com álcoois (0,84), em QMA-BS, e FFA/ácido (0,78), em QMA-TS, bem como aos ácidos orgânicos. Os fungos filamentosos, presentes nesses tratamentos, demonstraram pelas correlações que há uma influência positiva sobre os ácidos orgânicos, principalmente o ácido butírico e o isovalérico, bem como os aeróbios mesófilos. Quanto a presença de *S. aureus*, detectada por pelo seA, foi

negativamente correlacionada as BALs (-0,95) e fungos filamentosos (-0,9), para QMA-BS, enquanto para QMA-TS, apenas os fungos filamentosos (-0.8) estavam relacionados.

Figure 8 - Correlações de Pearson das variáveis físico-químicas e microbiológicas dos tempos de maturação (0, 5, 10, 15, 20, 25, 30 dias). A) Fabricado em Bambuí inoculado com *S. aureus* (QMA-BS). B) Fabricados em Tapiraí e inoculados com *S. aureus* (QMA-TS). C) Fabricado em Bambuí e inoculado com *L. monocytogenes* (QMA-BL). D) Fabricado em Tapiraí inoculado com *L. monocytogenes* (QMA-TL). (*) A correlação é significativa em um nível de 0,05; (**) A correlação é significativa em um nível de 0,01; (***) A correlação é significativa em um nível de 0,001.



Fonte: Do autor (2023).

Quanto a correlação do queijos inoculados com *L. monocytogenes*, podem ser observados nas figuras 8C e 8D. Foi observado, no QMA-BL, uma correlação positiva do fungos filamentosos e das BALs, com os ácidos orgânicos, além de uma moderada correlação entre esse grupos microbianos. Em adição a isso os álcoois voláteis estava ligado diretamente ao crescimento as leveduras, observado por uma correlação positiva (0,84). Apesar disso, uma correlação negativa foi observada quando se analisa as outras classes químicas de compostos voláteis. O aumento do ácidos orgânicos, favorecem a presença dos grupos voláteis, por correlações positivas. Outras correlações importantes, foram observadas nos QMA-TL, das quais correlações positivas foram observadas entre os aeróbios mesófilos e as leveduras (0,82) de forma a influenciar na acidez final do queijos, bem como uma correlação positiva com

leveduras (0,64) e os aeróbios mesófilos (0,91) como a *L. monocytogenes*. Os fungos filamentosos apresentaram correlação positiva com a presença dos ésteres (0,8) e uma forte correlação negativa com o grupo volátil FFA/ácido (-0,65), indicando que foram responsáveis por transformações bioquímicas na maturação. Além disso, observou-se forte correlação negativa dos fungos filamentosos com a *L. monocytogenes* (-0,87).

4 DISCUSSÃO

Os queijos são considerados uma matriz alimentar adequada para a entrega de microrganismos benéficos, devido ao seu pH, elevado teor de gordura e baixa concentração de oxigênio (SOARES e colab., 2019). A presença de microrganismos benéficos promove reações bioquímicas para garantir a qualidade e segurança dos alimentos. Assim, a presença de diferentes complexos microbianos nos queijos produzidos em distintas fazendas queijeiras, afetou a interação dos grupos microbianos avaliados com os microrganismos de origem alimentar. O fato da correlação negativa entre as BAL e os fungos filamentosos, em QMA-BS e apenas as BALs, em QMA-TS, evidenciam isso, bem como a diferença da predominância das espécies *Lactococcus lactis subsp. lactis* e *Corynebacterium variabile* nesses queijos ao longo da maturação.

Neste estudo, um forte efeito inibitório da microbiota natural do queijo sobre o *S. aureus* e *L. monocytogenes* foi observado em todos os tratamentos, afetando principalmente a presença de *S. aureus*, onde houve uma redução maior da sua população. De maneira geral, as bactérias do ácido lático e fungos filamentosos produzem uma variedade de substâncias antimicrobianas e criam condições desfavoráveis para o crescimento de patógenos e organismos toxigênicos e deteriorantes (RAMOS e colab., 2010). Esse comportamento antagonista é influenciado pela proporção relativa entre a população de *S. aureus* e as BAL inicialmente, de forma que a redução de 4 log, durante a maturação é devido a decomposição de ácido lático e a formação de compostos básicos, como os ácidos orgânicos (JIA e colab., 2021b; NOGUEIRA VIÇOSA e colab., 2019). Esse comportamento é muito comum em alimentos crus e fermentados, principalmente, porque a repressão pela microbiota acompanhante leva a baixa competitividade (ÖZER e KESENKAŞ, 2019).

A inoculação de *Staphylococcus aureus* imprimiu mudança no perfil de voláteis logo na maturação, principalmente, nos queijos produzidos em Bambuí. Correlações moderadas e fortes ($p < 0,01$), com as cetonas, ácidos graxos livres e os alcanos foram observadas. Um baixo pH,

como o do queijo, pode ser responsável pelo estresse oxidativo nesse patógeno, tal qual na presença de octadecanal, tridecanal, tetradecanal, heptadecanal, que são produtos do estresse oxidativos, incluindo peroxidação lipídica presente (BAPTISTA e colab., 2019; MONTANARI e colab., 2013; REPETTO e colab., 2012). No entanto a contribuição desses voláteis para o sabor pode não ser significativa devido a concentração de população (5-7 log CFU/mL), concentração e limiar de odor, bem como os fatores abióticos (BORELLI e colab., 2016; HITCHINS e colab., 2007; KAMIMURA e colab., 2019; PENNA e colab., 2021; STAVROPOULOU e colab., 2015).

Tendo em vista que contaminação por *Listeria monocytogenes* é limitada a casca dos queijos, os fungos filamentosos, comumente associados a casca do queijos, foram o grupo microbiano responsável pela inibição desse patógeno, bem como pela produção de ácidos orgânicos (BERNINI e colab., 2013; MARTIN e COTTER, 2023). A população de *Listeria monocytogenes* também foi afetada pelo pH, principalmente, pelo aumento da concentração de ácidos orgânicos, evidenciado pela correlação negativa de ácido propiônico, isovalérico, butírico e acético. A ação desse ácidos foi observada em outros estudos, principalmente, quanto suas formas não dissociadas. Os ácidos, podem passar pela membrana plasmática, de forma a se dissociar no citoplasma da bactérias, aumentando a concentração de íons (TIRLONI e colab., 2021; WEMMENHOVE e colab., 2016). Assim, esses íons migram para fora da célula, inviabilizando o ambiente para os microrganismos (FOX, Patrick F. e colab., 2017; MITCHELL, 1961).

Além de acompanhar a população dos patógenos inoculados pelo qPCR, atestou-se a qualidade dos queijos minas artesanais, pelo monitoramento de *Staphylococcus coagulase positiva* e *L. monocytogenes* nos queijos. Observou-se que nos QMA-BS e QMA-TS, a população de *L. monocytogenes* não atendia a legislação, mesmo tendo uma queda de 5% e 3%, da população desse patógeno, respectivamente. Seguindo essa tendencia, a população de *Staphylococcus coagulase positiva* em QMA-BS reduziu 69,05%, enquanto em QMA-BL não variou ao longo do tempo. Dessa maneira as contagens microbiológicas dos queijos avaliados encontram-se fora dos limites de qualidade estabelecidos pela instrução normativa nº 161 de 2022. Para que os queijos atendam a legislação brasileira, o produto derivado do leite, deve cumprir toda a normativa, bem como as diretrizes baseadas em princípios de Boas Práticas de Fabricação (GMPs) e Procedimentos Operacionais Padrão de Saneamento (SSOPs) (BRASIL, 2022; LACORTE e colab., 2022).

Vale lembrar que a maturação não é considerada um ponto crítico de controle, principalmente, porque é um período determinado para a construção do sabor, aroma e textura

do queijo, auxiliado pelas transformações bioquímicas e pelo consórcio microbiano presente (SANT'ANNA e colab., 2019). No entanto, o período estabelecido de maturação para garantir a inocuidade dos queijos minas artesanais produzidos na região da canastra é de 14 dias (IMA, 2021)(IMA, 2021), foi observado que o processo de maturação de 30 dias, sozinho, pode não ser suficiente para a redução completa de patógenos contaminantes, principalmente, pela presença de *Listeria monocytogenes*. Porém, a análise do cenário indicou que a maturação do queijo semiduro reduziu o risco.

5 CONCLUSÃO

A presença de patógenos modifica a dinâmica da população dos queijos. Além disso, o sinergismo entre pH e a microbiota endógena do queijo da região da canastra foram responsáveis pela redução da contagem de *L. monocytogenes* e *S. aureus* ao final de 30 dias de maturação. No entanto, esse período não foi suficiente para inativar totalmente os patógenos, visto que os queijos não se adequaram a legislação. Logo, novos estudos para viabilizar a inativação de patógenos de origem alimentar ou adequação de higiene devem ser encorajados para garantir a segurança alimentar desses queijos.

AGRADECIMENTOS

Os autores gostariam de agradecer à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG: CBB - APQ-04472-17), ao Instituto Agropecuário Mineiro (IMA), ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico, Tecnológico (CNPq) e Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES: Código Financeiro 001) pelo fornecimento dos equipamentos e apoio financeiro, e aos produtores de queijo minas artesanal da região da canastra.

REFERÊNCIAS

ANDRADE, Rafaela Pereira e colab. **Survival of *Kluyveromyces lactis* and *Torulaspora delbrueckii* to simulated gastrointestinal conditions and their use as single and mixed inoculum for cheese production.** Food Research International, v. 125, p. 108620, Nov 2019. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0963996919304983>>.

AOAC. **Association of Official Analytical Chemists.** 20. ed. Gaithersburg, Md: AOAC International., 2016.

BAPTISTA, Inês e colab. **A comprehensive look into the volatile exometabolome of enteroxic and non-enterotoxic *Staphylococcus aureus* strains.** *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, v. 108, p. 40–50, Mar 2019.

BARZIDEH, Zoha e colab. **Dynamics of Starter and Non-Starter Lactic Acid Bacteria Populations in Long-Ripened Cheddar Cheese Using Propidium Monoazide (PMA) Treatment.** *Microorganisms*, v. 10, n. 8, p. 1669, 19 Ago 2022.

BATISTA, Nadia Nara e colab. **Dynamic behavior of *Saccharomyces cerevisiae*, *Pichia kluyveri* and *Hanseniaspora uvarum* during spontaneous and inoculated cocoa fermentations and their effect on sensory characteristics of chocolate.** *LWT - Food Science and Technology*, v. 63, n. 1, p. 221–227, Set 2015.

BERNINI, Valentina e colab. **The presence, genetic diversity and behaviour of *Listeria monocytogenes* in blue-veined cheese rinds during the shelf life.** *Food Control*, v. 34, n. 2, p. 323–330, Dez 2013.

BEUVIER, E. e BUCHIN, S. *Raw Milk Cheeses*. [S.l: s.n.], 2004. p. 319–345.

BORELLI, Beatriz Martins e colab. **Traditional cheeses produced in Brazil: characterisation, production technologies and health implications.** *Food microbiology fundamentals, challenges and health implications*. New York: Nova Science Publishers, Inc, p. 161–189, 2016.

BRASIL. AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Instrução normativa nº 161 de 1º de julho de 2022.** Disponível em:

<http://antigo.anvisa.gov.br/documents/10181/2718376/IN_161_2022_.pdf/b08d70cb-add6-47e3-a5d3-fa317c2d54b2>. Acesso em: 26 abr 2023.

CAMPAGNOLLO, Fernanda B. e colab. **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*, v. 73, p. 288–297, Ago 2018.

CAMPOS, Gabriela Zampieri e colab. **Microbiological characteristics of canastra cheese during manufacturing and ripening.** *Food Control*, v. 121, p. 107598, Mar 2021.

Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0956713520305144>>.

CHEN, Qing-Chan e colab. **Aroma impact compounds in Liuyang douchi, a Chinese traditional fermented soya bean product.** *International Journal of Food Science & Technology*, v. 46, n. 9, p. 1823–1829, Set 2011.

DEMAN, L. e DEMAN, J. M. **trans Fatty acids in milkfat.** *Journal of the American Oil Chemists' Society*, v. 60, n. 6, p. 1095–1098, Jun 1983.

DEMIRCI, Talha e colab. **Lactic acid bacteria diversity and dynamics during ripening of traditional Turkish goatskin Tulum cheese produced in Mut region assessed by culturing and PCR-DGGE.** *LWT*, v. 138, p. 110701, Mar 2021.

EMATER. EMPRESA DE ASSISTENCIA TECNICA E EXTENSÃO RURAL DO ESTADO DE MINAS GERAIS. **Minas gerais poderá reconhecer mais uma região**

produtora do queijo minas artesanal. Disponível em:

<https://www.emater.mg.gov.br/portal.do/site-noticias/minas-gerais-podera-reconhecer-mais-uma-regiao-produtora-do-queijo-minas-artesanal-/?flagweb=novosite_pagina_interna_noticia&id=25910>.

FENG, Tao e colab. **Volatile profiles of two genotype *Agaricus bisporus* species at different growth stages.** *Food Research International*, v. 140, p. 109761, Fev 2021.

FOX, Edward M. e JIANG, Yujun e GOBIUS, Kari S. **Key pathogenic bacteria associated with dairy foods: On-farm ecology and products associated with foodborne pathogen transmission.** *International Dairy Journal*, v. 84, p. 28–35, Set 2018.

FOX, Patrick F. e colab. **Microbiology of Cheese Ripening. Fundamentals of Cheese Science.** Boston, MA: Springer US, 2017. p. 333–390. Disponível em: <http://link.springer.com/10.1007/978-1-4899-7681-9_11>.

FUKA, Mirna Mrkonjić e colab. **Dynamics of Bacterial Communities during the Ripening Process of Different Croatian Cheese Types Derived from Raw Ewe's Milk Cheeses.** *PLoS ONE*, v. 8, n. 11, p. e80734, 20 Nov 2013.

GLEESON, D. e O'CONNELL, A. e JORDAN, K. **Review of potential sources and control of thermophilic bacteria in bulk-tank milk.** *Irish Journal of Agricultural and Food Research*, v. 52, n. 2 SPEC. IS, p. 217–227, 2013.

HAVELAAR, Arie H. e colab. **World Health Organization Global Estimates and Regional Comparisons of the Burden of Foodborne Disease in 2010.** *PLOS Medicine*, v. 12, n. 12, p. e1001923, 3 Dez 2015.

HITCHINS, Anthony D. e JINNEMAN, Karen e CHEN, Yi. **Detection of *Listeria monocytogenes* in Foods and Environmental Samples, and Enumeration of *Listeria monocytogenes* in Foods.** *Bacteriological Analytical Manual*. 8. ed. [S.l.]: Food and drug administration, 2007. p. 47. Disponível em: <<https://www.fda.gov/food/laboratory-methods-food/bam-chapter-10-detection-listeria-monocytogenes-foods-and-environmental-samples-and-enumeration>>.

HONG, Yeun e JUNG, Hyun-Ji e KIM, Hae-Yeong. **Aroma characteristics of fermented Korean soybean paste (Doenjang) produced by *Bacillus amyloliquefaciens*.** *Food Science and Biotechnology*, v. 21, n. 4, p. 1163–1172, 31 Ago 2012.

IMA. INSTITUTO MINEIRO DE AGROPECUÁRIA.

Portaria nº 2051, de 07 de abril de 2021. 2021. Disponível em:

<<http://ima.mg.gov.br/files/1739/Ano-2021/18551/Portaria-n%C2%B0-2051,-de-07-de-abril-de-2021.pdf>>. Acesso em: 23 maio 2023.

JIA, Rong e colab. **Physicochemical and textural characteristics and volatile compounds of semihard goat cheese as affected by starter cultures.** *Journal of Dairy Science*, v. 104, n. 1, p. 270–280, Jan 2021a.

JIA, Rong e colab. **Physicochemical and textural characteristics and volatile compounds of semihard goat cheese as affected by starter cultures.** Journal of Dairy Science, v. 104, n. 1, p. 270–280, Jan 2021b.

KAMIMURA, Bruna A. e colab. **Amplicon sequencing reveals the bacterial diversity in milk, dairy premises and Serra da Canastra artisanal cheeses produced by three different farms.** Food Microbiology, v. 89, p. 103453, Ago 2020. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0740002020300423>>.

KAMIMURA, Bruna A. e colab. **Brazilian Artisanal Cheeses: An Overview of their Characteristics, Main Types and Regulatory Aspects.** Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety, v. 18, n. 5, p. 1636–1657, 21 Set 2019.

KILCAWLEY, Kieran N. **Cheese Flavour.** Fundamentals of Cheese Science. Boston, MA: Springer US, 2017. p. 443–474.

KOUSTA, Maria e colab. **Prevalence and sources of cheese contamination with pathogens at farm and processing levels.** Food Control, v. 21, n. 6, p. 805–815, Jun 2010. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0956713509003235>>.

LACORTE, Gustavo Augusto e colab. **Investigating the influence of Food Safety Management Systems (FSMS) on microbial diversity of Canastra cheeses and their processing environments.** Food Microbiology, v. 105, p. 104023, Ago 2022.

LASEKAN, Ola e ABBAS, Kassim. **Analysis of volatile flavour compounds and acrylamide in roasted Malaysian tropical almond (*Terminalia catappa*) nuts using supercritical fluid extraction.** Food and Chemical Toxicology, v. 48, n. 8–9, p. 2212–2216, Ago 2010.

LEDO, James e colab. **Persistent challenges in safety and hygiene control practices in emerging dairy chains: The case of Tanzania.** Food Control, v. 105, p. 164–173, Nov 2019.

LI, Chunping e colab. **Identification of the aroma compounds in stinky mandarin fish (*Siniperca chuatsi*) and comparison of volatiles during fermentation and storage.** International Journal of Food Science & Technology, p. n/a-n/a, Jul 2013.

LU, Yulin e colab. **Identification of aroma compounds in Zhuhoujiang, a fermented soybean paste in Guangdong China.** LWT, v. 142, p. 111057, Maio 2021.

MARTIN, José Guilherme Prado e COTTER, Paul D. **Filamentous fungi in artisanal cheeses: A problem to be avoided or a market opportunity?** Heliyon, v. 9, n. 4, p. e15110, Abr 2023.

MELO, J. e ANDREW, P.W. e FALEIRO, M.L. **Listeria monocytogenes in cheese and the dairy environment remains a food safety challenge: The role of stress responses.** Food Research International, v. 67, p. 75–90, Jan 2015.

MITCHELL, PETER. **Coupling of Phosphorylation to Electron and Hydrogen Transfer by a Chemi-Osmotic type of Mechanism.** Nature, v. 191, n. 4784, p. 144–148, Jul 1961.

- MONTANARI, C. e colab. **Oxylipins generation in *Lactobacillus helveticus* in relation to unsaturated fatty acid supplementation.** *Journal of Applied Microbiology*, v. 115, n. 6, p. 1388–1401, Dez 2013.
- MORAN, Lara e colab. **Characterization of volatile compounds of cooked wild Iberian red deer meat extracted with solid phase microextraction and analysed by capillary gas chromatography - mass spectrometry.** *LWT*, v. 163, p. 113472, Jun 2022.
- NJONGMETA, Nenge Azefor e colab. **Acid-Producing Microorganisms.** *Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods*. 8. ed. [S.l.]: American Public Health Association, 2015.
- NOGUEIRA VIÇOSA, Gabriela e colab. **Impact of co-cultivation with *Enterococcus faecalis* over growth, enterotoxin production and gene expression of *Staphylococcus aureus* in broth and fresh cheeses.** *International Journal of Food Microbiology*, v. 308, p. 108291, Nov 2019.
- ÖZER, Elif e KESENKAŞ, Harun. **The effect of using different starter culture combinations on ripening parameters, microbiological and sensory properties of Mihaliç cheese.** *Journal of Food Science and Technology*, v. 56, n. 3, p. 1202–1211, 21 Mar 2019.
- PENNA, Ana Lucia Barretto e GIGANTE, Mirna Lucia e TODOROV, Svetoslav Dimitrov. **Artisanal Brazilian Cheeses—History, Marketing, Technological and Microbiological Aspects.** *Foods*, v. 10, n. 7, p. 1562, 6 Jul 2021.
- PINTO, Maximiliano Soares e colab. **Survival of *Listeria innocua* in Minas Traditional Serro cheese during ripening.** *Food Control*, v. 20, n. 12, p. 1167–1170, Dez 2009.
- PRAIA, Ana Beatriz e colab. **Sour Beer with *Lactocaseibacillus paracasei* subsp. *paracasei* F19: Feasibility and Influence of Supplementation with *Spondias mombin* L. Juice and/or By-Product.** *Foods*, v. 11, n. 24, p. 4068, 16 Dez 2022.
- PUERARI, Cláudia e MAGALHÃES, Karina Teixeira e SCHWAN, Rosane Freitas. **New cocoa pulp-based kefir beverages: Microbiological, chemical composition and sensory analysis.** *Food Research International*, v. 48, n. 2, p. 634–640, Out 2012.
- RAMOS, Cíntia Lacerda e colab. **Determination of dynamic characteristics of microbiota in a fermented beverage produced by Brazilian Amerindians using culture-dependent and culture-independent methods.** *International Journal of Food Microbiology*, v. 140, n. 2–3, p. 225–231, Jun 2010.
- REPETTO, M. e SEMPRINE, J. e BOVERIS, A. **Lipid Peroxidation.** [S.l.]: InTech, 2012.
- RYCHLIK, Tomasz e colab. **Application of the PCR-DGGE technique to the fungal community of traditional Wielkopolska fried ripened curd cheese to determine its PGI authenticity.** *Food Control*, v. 73, p. 1074–1081, Mar 2017.
- RYSER, Elliot T. e SCHUMAN, James D. **Mesophilic Aerobic Plate Count.** *Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods*. 8. ed. [S.l.]: American Public Health Association, 2015.

RYU, Dojin e WOLF-HALL, Charlene. **Yeasts and Molds**. Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods. 8. ed. [S.l.]: American Public Health Association, 2015.

SANT'ANNA, Felipe Machado e colab. **Microbial shifts in Minas artisanal cheeses from the Serra do Salitre region of Minas Gerais, Brazil throughout ripening time**. Food Microbiology, v. 82, p. 349–362, Set 2019. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0740002018309870>>.

SASANAM, Sirinapa e colab. **Production of process flavorings from methionine, thiamine with <scp>d</scp> -xylose or dextrose by direct extrusion: Physical properties and volatile profiles**. Journal of Food Science, v. 87, n. 3, p. 895–910, 4 Mar 2022.

SILVA, Cíntia B. e colab. **Microbiological quality and cultivable bacterial community of fresh and ripened Minas cheeses made from raw and pasteurised milk**. International Dairy Journal, v. 143, p. 105662, Ago 2023.

SOARES, Mariana B. e colab. **The resistance of Bacillus, Bifidobacterium, and Lactobacillus strains with claimed probiotic properties in different food matrices exposed to simulated gastrointestinal tract conditions**. Food Research International, v. 125, p. 108542, Nov 2019.

STAVROPOULOU, Despoina Angeliki e colab. **Amino acid conversions by coagulase-negative staphylococci in a rich medium: Assessment of inter- and intraspecies heterogeneity**. International Journal of Food Microbiology, v. 212, p. 34–40, Nov 2015.

THE GOOD SCENTS COMPANY. **The Good Scents Company Information System**. Disponível em: <<http://www.thegoodscentscompany.com/search2.html>>. Acesso em: 8 maio 2023.

TIRLONI, Erica e colab. **Effectiveness of lactic and acetic acids on the growth of Listeria monocytogenes and Bacillus cereus in primo sale fresh cheese**. LWT, v. 151, p. 112170, Nov 2021.

VALE, Rosana Campos Do e RODRIGUES, Maria Paula Jansen e MARTINS, José Manoel. **Influência do tipo de fermento nas características físico-químicas de queijo Minas artesanal do serro – Minas Gerais, maturado em condições controladas**. Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes, v. 73, n. 2, p. 82–90, 13 Nov 2018. Disponível em: <<https://www.revistadoilct.com.br/riict/article/view/686>>.

VARLET, Vincent e colab. **Comparison of Odor-Active Volatile Compounds of Fresh and Smoked Salmon**. Journal of Agricultural and Food Chemistry, v. 54, n. 9, p. 3391–3401, 1 Maio 2006.

VILLAVERDE, M. Luciana e JUÁREZ, M. Patricia e MIJAILOVSKY, Sergio. **Detection of Tribolium castaneum (Herbst) volatile defensive secretions by solid phase microextraction–capillary gas chromatography (SPME-CGC)**. Journal of Stored Products Research, v. 43, n. 4, p. 540–545, Jan 2007.

WEI, Shuai e colab. **Detection of *Listeria monocytogenes* using Dynabeads® anti-*Listeria* combined with real-time PCR in soybean sprouts.** LWT, v. 99, p. 533–539, Jan 2019.

WEMMENHOVE, Ellen e colab. **Minimal inhibitory concentrations of undissociated lactic, acetic, citric and propionic acid for *Listeria monocytogenes* under conditions relevant to cheese.** Food Microbiology, v. 58, p. 63–67, Set 2016.

WHO. WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Foodborne diseases.** Disponível em: <https://www.who.int/health-topics/foodborne-diseases#tab=tab_1>. Acesso em: 16 maio 2023.

APÊNDICE II - Material suplementar

Table S1. Specific primers used for qPCR analysis and qPCR parameters of standard curves obtained from 10-fold dilution of yeast strains DNA by qPCR.

Species	Primers (5'→3')		Amplicon (bp)	Reference
	Name	Sequence		
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 13565	seaR	5'-TCAGGAGTTGGATCTTCAAGCA-3'	91	(NOGUEIRA VIÇOSA e colab., 2019)
	seaF	5'-TCCCCTCTGAACCTTCCCAT-3'		
<i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 19117	HlyaR	5'-ATC CGC GTG TTT CTT TTC GA-3'	64	(WEI e colab., 2019)
	HlyaF	5'-CAT GGC ACC ACC AGC ATC T-3'		

Table S2. Physicochemical parameters, organic acids (mg. g⁻¹) and lactose (mg. g⁻¹) of minas artisanal cheese produced on different farms in the Canastra microregion ripened for 30 days inoculated with *Staphylococcus aureus* ATCC13565.¹

Parameters	Bambui							Tapirai						
	0	5	10	15	20	25	30	0	5	10	15	20	25	30
ph	4,72±0,11 ^{ca}	4,83±0,04 ^{ab}	5,07±0,26 ^{ba}	5,08±0,03 ^{ba}	5,33±0,07 ^{aa}	5,35±0,06 ^{aa}	5,30±0,11 ^{ca}	4,78±0,04 ^{ca}	5,01±0,23 ^{ca}	4,95±0,02 ^{ca}	5,39±0,22 ^{ca}	5,15±0,02 ^{bb}	5,21±0,04 ^{ba}	5,23±0,05 ^{ba}
ATT	1,52±0,11 ^{bb}	1,57±0,02 ^{bb}	1,49±0,16 ^{bb}	1,29±0,08 ^{bb}	1,70±0,06 ^{aa}	1,69±0,06 ^{ab}	1,95±0,24 ^{bb}	2,42±0,12 ^{ca}	2,71±0,23 ^{ca}	1,79±0,08 ^{ca}	2,34±0,10 ^{ca}	1,79±0,05 ^{ca}	2,10±0,20 ^{ca}	2,48±0,16 ^{ca}
Lactose	3,75±0,66 ^{ca}	1,10±0,11 ^{ca}	0,46±0,08 ^{bb}	2,90±0,23 ^{ba}	2,70±0,38 ^{ba}	2,45±0,53 ^{ba}	2,46±0,06 ^{ba}	2,13±0,23 ^{bb}	1,22±0,09 ^{ba}	1,25±0,18 ^{ba}	1,06±0,0,14 ^{bb}	1,08±0,04 ^{bb}	1,16±0,16 ^{bb}	1,46±0,19 ^{bb}
Organic acids														
Citric acid	5,76±0,94 ^{ca}	3,18±0,55 ^{ca}	3,67±0,17 ^{ca}	3,18±0,40 ^{ca}	3,42±0,15 ^{ca}	4,39±1,05 ^{ba}	2,96±0,23 ^{bb}	8,34±0,91 ^{bb}	6,48±0,78 ^{bb}	5,36±0,96 ^{bb}	2,56±0,40 ^{ca}	4,05±0,25 ^{ca}	4,89±0,30 ^{ca}	5,80±1,10 ^{ba}
Tartaric acid	0,50±0,03 ^{ca}	0,29±0,02 ^{ca}	0,25±0,02 ^{ca}	0,16±0,06 ^{bb}	0,06±0,04 ^{bb}	0,04±0,03 ^{bb}	0,02±0,01 ^{bb}	ND	ND	ND	0,78±0,22 ^{ca}	0,28±0,03 ^{ba}	0,31±0,03 ^{ba}	0,42±0,32 ^{ba}
Malic acid	0,50±0,12 ^{ca}	0,22±0,10 ^{ca}	0,19±0,03 ^{ca}	0,19±0,02 ^{ca}	0,23±0,02 ^{ca}	0,23±0,05 ^{ca}	0,25±0,04 ^{ca}	ND	ND	ND	0,11±0,07 ^{bb}	ND	ND	ND
Succinic acid	1,48±1,14 ^{ca}	0,75±0,17 ^{ca}	0,59±0,22 ^{ca}	0,60±0,15 ^{ca}	0,63±0,02 ^{ca}	0,75±0,21 ^{bb}	0,48±0,08 ^{ca}	0,61±0,05 ^{bb}	0,57±0,21 ^{ca}	0,43±0,31 ^{ca}	0,72±0,37 ^{ca}	0,75±0,08 ^{ca}	0,73±0,03 ^{ca}	0,64±0,14 ^{ca}
Lactic acid	22,75±1,72 ^{ca}	23,59±1,61 ^{ca}	21,86±1,16 ^{bb}	19,64±0,61 ^{ca}	19,57±3,52 ^{bb}	17,64±0,43 ^{bb}	20,58±2,66 ^{bb}	27,04±2,51 ^{ca}	23,92±3,83 ^{ca}	25,51±4,28 ^{ca}	19,57±0,42 ^{ca}	22,81±3,33 ^{ca}	26,78±4,49 ^{ca}	24,38±2,90 ^{ca}
Acetic acid	0,20±0,13 ^{ca}	0,30±0,14 ^{ca}	0,54±0,20 ^{ca}	1,16±0,11 ^{ca}	1,54±0,55 ^{ca}	1,47±0,52 ^{ca}	1,55±0,34 ^{ca}	0,21±0,04 ^{ca}	0,08±0,00 ^{ca}	ND	0,43±0,10 ^{bb}	0,36±0,07 ^{bb}	0,32±0,08 ^{bb}	0,34±0,00 ^{bb}
Propionic acid	ND ²	ND	0,34±0,07 ^{bb}	0,76±0,08 ^{ca}	1,37±0,45 ^{ca}	2,20±0,30 ^{ca}	1,31±0,12 ^{ca}	ND	ND	1,14±0,29 ^{ca}	0,82±0,06 ^{ca}	1,57±0,32 ^{ca}	1,87±0,50 ^{ca}	1,52±0,19 ^{ca}
Butyric acid	0,23±0,03 ^{ca}	0,28±0,01 ^{ca}	0,28±0,05 ^{ca}	0,40±0,17 ^{ca}	0,44±0,18 ^{bb}	0,41±0,02 ^{bb}	0,42±0,13 ^{bb}	0,30±0,05 ^{ca}	0,43±0,06 ^{ca}	0,60±0,13 ^{ca}	0,74±0,42 ^{ca}	0,89±0,20 ^{ca}	0,95±0,05 ^{ca}	0,98±0,58 ^{ca}
Isovaleric acid	2,07±0,51 ^{ca}	1,83±1,30 ^{bb}	3,47±0,19 ^{bb}	3,51±0,25 ^{ba}	5,22±0,88 ^{ca}	5,69±0,24 ^{ca}	5,59±1,06 ^{ca}	1,45±0,30 ^{ca}	3,06±0,55 ^{ca}	6,88±0,44 ^{ca}	1,93±1,44 ^{bb}	5,29±0,45 ^{ba}	5,80±0,33 ^{ba}	4,67±0,51 ^{ba}

¹Lower case vertical letters show significant difference by Scott-knott test with p<0.05 and upper case vertical letters show statistical difference by T test with p<0.05. ²ND means that the compound was not detected.

Table S3. Physicochemical parameters, organic acids (mg.g⁻¹) and lactose (mg.g⁻¹) of minas cheese artisanal produced on different farms in the Canastra microregion ripened for 30 days inoculated with *Listeria monocytogenes* ATCC19117.¹

Parameters	Bambui							Tapirai						
	0	5	10	15	20	25	30	0	5	10	15	20	25	30
ph	4,84±0,04 ^{aA}	4,91±0,06 ^{dA}	5,08±0,06 ^{dA}	5,43±0,02 ^{dB}	5,43±0,02 ^{bA}	5,24±0,01 ^{aA}	5,29±0,09 ^{bA}	4,80±0,06 ^{aA}	4,97±0,03 ^{dA}	5,07±0,08 ^{aA}	5,44±0,03 ^{aA}	5,22±0,07 ^{dB}	5,28±0,06 ^{bA}	5,31±0,03 ^{bA}
ATT	1,41±0,04 ^{dB}	1,46±0,05 ^{dB}	2,08±0,08 ^{aA}	1,81±0,08 ^{aA}	1,81±0,08 ^{bA}	1,79±0,07 ^{dB}	1,80±0,21 ^{dB}	2,54±0,04 ^{dA}	2,61±0,08 ^{dA}	1,77±0,10 ^{dB}	1,95±0,07 ^{dB}	1,701±0,09 ^{aA}	2,23±0,19 ^{aA}	2,36±0,12 ^{aA}
Lactose	6,38±0,24 ^{aA}	5,57±0,34 ^{aA}	4,52±0,37 ^{bA}	3,81±0,35 ^{aA}	3,11±0,25 ^{aA}	3,72±0,97 ^{aA}	2,96±0,12 ^{aA}	3,09±0,33 ^{dB}	1,19±0,17 ^{dB}	1,08±0,09 ^{bA}	1,04±0,06 ^{dB}	1,00±0,08 ^{dB}	1,48±0,09 ^{dB}	1,00±0,09 ^{bA}
Organic acids														
Citric acid	2,13±0,34 ^{dB}	0,89±0,56 ^{dB}	1,26±0,35 ^{dB}	0,88±0,40 ^{dB}	0,21±0,22 ^{dB}	ND	ND	8,50±0,37 ^{aA}	6,85±0,43 ^{bA}	5,36±0,74 ^{aA}	2,55±0,4 ^{aA}	4,21±0,37 ^{dA}	6,39±0,91 ^{bA}	4,30±0,69 ^{dA}
Tartaric acid	0,73±0,13 ^{aA}	0,13±0,00 ^{dB}	0,12±0,03 ^{dB}	0,11±0,02 ^{dB}	0,13±0,03 ^{dB}	0,19±0,10 ^{dB}	0,17±0,05 ^{bA}	0,49±0,04 ^{dB}	0,82±0,12 ^{aA}	0,37±0,06 ^{dA}	0,66±0,03 ^{bA}	0,24±0,03 ^{aA}	0,35±0,08 ^{dA}	0,21±0,04 ^{aA}
Malic acid	0,73±0,02 ^{aA}	0,20±0,17 ^{aA}	0,15±0,01 ^{aA}	0,15±0,01 ^{aA}	0,21±0,02 ^{aA}	0,31±0,09 ^{bA}	0,36±0,03 ^{bA}	0,05±0,01 ^a	ND	ND	0,11±0,05 ^{aA}	ND	ND	ND
Succinic acid	0,97±0,12 ^{dB}	0,43±0,12 ^{aA}	0,25±0,06 ^{dB}	0,40±0,03 ^{dB}	0,39±0,10 ^{dB}	0,73±0,32 ^{bA}	0,64±0,07 ^{dB}	0,70±0,03 ^{aA}	0,34±0,08 ^{dA}	0,80±0,13 ^{aA}	1,01±0,02 ^{bA}	0,72±0,17 ^{aA}	0,36±0,04 ^{dB}	1,24±0,17 ^{aA}
Lactic acid	21,95±2,00 ^{aA}	23,37±0,45 ^{aA}	25,79±3,52 ^{aA}	22,76±0,92 ^{aA}	20,18±0,44 ^{aA}	23,83±8,34 ^{aA}	22,15±3,24 ^{aA}	27,96±1,16 ^{aA}	24,83±2,60 ^{aA}	22,41±2,98 ^{bA}	17,55±4,23 ^{bA}	23,52±3,57 ^{bA}	28,80±4,56 ^{aA}	27,94±4,26 ^{aA}
Acetic acid	0,08±0,02 ^{aA}	0,35±0,13 ^{aA}	0,32±0,07 ^{aA}	1,04±0,20 ^{bA}	1,57±0,17 ^{aA}	1,44±0,58 ^{aA}	1,20±0,89 ^{bA}	0,12±0,02 ^{bA}	ND	ND	0,28±0,04 ^{dB}	ND	0,43±0,03 ^{dB}	ND
Propionic acid	0,32±0,08 ^{aA}	0,24±0,06 ^{aA}	0,50±0,05 ^{aA}	0,70±0,39 ^{bA}	1,06±0,05 ^{bA}	1,85±0,18 ^{aA}	2,32±0,78 ^{aA}	ND	0,40±0,05 ^{aA}	0,68±0,13 ^{aA}	0,46±0,02 ^{aA}	0,89±0,35 ^{bA}	1,19±0,21 ^{dB}	1,62±0,20 ^{dB}
Butyric acid	0,20±0,01 ^{aA}	0,36±0,07 ^{aA}	0,34±0,09 ^{aA}	0,48±0,03 ^{dB}	0,41±0,11 ^{aA}	0,68±0,10 ^{aA}	0,59±0,02 ^{dB}	0,30±0,05 ^{bA}	0,51±0,11 ^{bA}	0,57±0,06 ^{bA}	0,81±0,22 ^{bA}	0,63±0,25 ^{bA}	0,65±0,07 ^{aA}	3,69±0,41 ^{aA}
Isovaleric acid	0,92±0,75 ^{dA}	1,85±1,36 ^{dB}	3,16±0,60 ^{aA}	4,39±0,07 ^{bA}	4,54±0,54 ^{bA}	5,95±1,80 ^{bA}	7,07±0,71 ^{aA}	1,45±0,30 ^{dA}	4,29±0,65 ^{bA}	4,53±0,69 ^{bA}	3,30±0,87 ^{aA}	5,88±1,05 ^{aA}	4,38±0,97 ^{dB}	6,28±0,95 ^{aA}

¹Lower case vertical letters show significant difference by Scott-knott test with p<0.05 and upper case vertical letters show statistical difference by T test with p<0.05. ²ND means that the compound was not detected.

Table S4. Identification of eukaryotes and prokaryotes by sequencing portions of the V3 16s rRNA region and fragment of the 18s rRNA gene, respectively, from two farms producing artisanal minas cheese from the canastra microregion.¹

Farm	Closest relatives	Bandas	Similarity (%)	Genbank accession ID
Eukaryotes				
	<i>Kluyveromyces lactis</i>	2, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 13, 14, 15, 16 e 17	99,60	CP042458.2
	<i>Candida sp.</i>	12	87,36	MH545927.1
Prokaryotes				
Tapiraí	<i>Lactococcus lactis subsp. lactis</i>	21, 24, 25, 26, 30, 33, 34, 36, 37, 38, 39, 54, 55 e 60	98,79	EU337111.1
	<i>Lactococcus sp.</i>	19, 20 e 61	85,23	MF280163.1
	<i>Lactococcus garvieae</i>	18	96,34	OP420803.1
	<i>Streptococcus ferus</i>	27, 32	94,55	LS483343.1
	<i>Lentilactobacillus hilgardii</i>	45	90,99	CP050262.1
	<i>Corynebacterium variable</i>	42,43, 44 e 46	100	MT573863.1
	<i>Corynebacterium sp.</i>	62	85,23	KP114214.1
	<i>Brevibacterium sediminis</i>	50 e 51	96,95	MN918417.1
	Eukaryotes			
	<i>Diutina catenulata</i>	69,76, 77 e 78	98,95	MK394156.1
	<i>Diutina sp.</i>	66, 68, 74 e 75	86,96	MK394156.1
	<i>Meyerozyma sp.</i>	73	83,56	KM222231.1
	<i>Kluyveromyces lactis</i>	70, 71 e 72	98,61	CP042458.1
Bambuí	Prokaryotes			
	<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	89, 90, 95, 98, 99 e 104	94,58	OQ581794.0
	<i>Bacillus sp.</i>	94, 101,	79,66	MW148418.1
	<i>Staphylococcus gallinarum</i>	93	99,13	OQ606811.1
	<i>uncultured bacterium</i>	91	85,11	KT768721.1

<i>uncultured Staphylococcus sp.</i>	96	96,36	KF508152.1
<i>uncultured Halanaerobacter sp.</i>	97	86,67	EF459724.1
<i>Staphylococcus sp.</i>	100	82,98	OQ581794.1
<i>Lactobacillus curvatus</i>	103 e 105	91,41	DQ336384.1
<i>uncultured Bacillus sp.</i>	106	87,28	LN875315.1
<i>Lactococcus lactis</i>	107 e 109	97,47	OP901763.1 ; OP714092.1
<i>uncultured Chloroflexota bacterium</i>	114	93,33	EU822297.1
<i>Corynebacterium variabile</i>	115, 116, 117, 120, 121, 122, 123, 124, 125, 127, 130, 131 e 141	97,74	MT573863.1
<i>Uncultured Actinomycetales bacterium</i>	126	93,2	HM075136.1
<i>uncultured proteobacterium</i>	128 e 129	100	GU219959.1 ; GU219959.2
<i>Ralstonia sp.</i>	142	84,16	KX901880.1
<i>Staphylococcus sp.</i>	144	85,99	MN540905.1
<i>uncultured Trichococcus sp.</i>	146	88,78	EU919224.1

Table S5. Volatile compounds (%) determined by HS-SPME/GC-MS in minas artisanal cheese produced on different farms in the Canastra microregion ripened for 30 days inoculated with *Staphylococcus aureus* ATCC13565.¹

No.	Class	Volatile compounds	Odor descriptors	Retention Time	Retention Index	Bambui							Tapirai						
						0	5	10	15	20	25	30	0	5	10	15	20	25	30
FFA/Acids																			
1		Isobutyric anhydride	Unpleasant, parmesan cheese, acidic, sweaty, sour fruit, apple peel, rancid, sharp, pungent aroma characters ³	19.493	992	12,0	0,8	0,6	ND	ND	ND	6,3	31,5	37,8	24,5	21,9	30,7	42,0	ND
2		Hexadecanoic acid	Waxy fatty ²	42.671	1968	0,9	0,2	0,3	0,6	0,7	0,3	0,2	2,1	1,0	2,2	0,4	ND	0,8	ND
3		9-Octadecenoic acid	Fatty, waxy, lard, fried ²	38.285	2175	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	0,8	ND	ND	ND
		Total				12,9	1,0	1,0	0,6	0,7	0,3	6,5	33,6	38,8	26,7	23,1	30,7	42,7	ND
Alcohols																			
4		Phenylethyl Alcohol	Floral rose, rose dried, honey, spice ^{2,5}	27.810	1136	33,6	49,8	52,2	47,3	57,4	55,2	51,3	2,1	5,5	7,5	1,2	4,2	2,4	3,1
5		3-methyl-1-Butanol	Fusel, alcoholic whiskey, fruity, banana ^{2,6}	8.140	697	6,0	7,3	3,3	6,2	10,2	12,5	5,8	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
6		2-hexyl-1-decanol	-	26.002	1790	2,6	1,6	1,6	0,7	1,3	0,9	1,3	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
7		1-Pentadecanol	-	35.820	1755	ND	0,2	0,2	0,1	0,1	0,1	0,1	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
8		3,7,11,15-Tetramethyl-1-Hexadecanol	-	37.676	1996	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
9		3-(methylthio)-1-propanol	Sulfurous onion sweet, soup vegetable ²	23.406	912	ND	0,6	0,0	1,0	0,6	0,7	0,5	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
		Total				42,2	59,5	57,3	55,3	69,7	69,3	59,1	2,1	5,5	7,5	1,5	4,2	2,4	3,1
Aldehydes																			
10		Tetradecane	Mild waxy ²	17.848	1413	0,0	0,7	0,7	0,5	0,8	0,5	0,6	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
11		Hexadecane	-	20.777	1612	0,9	0,4	0,5	0,3	0,4	0,3	0,3	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
12		1-Heptadecene	-	24.544	1701	1,0	0,4	0,4	0,3	0,4	0,3	0,3	1,5	1,4	5,6	0,3	1,5	0,9	2,5
13		(2E)-3,7,11,15-Tetramethyl-2-Hexadecene	-	27.452	1802	1,0	0,8	0,8	0,4	0,6	0,4	0,7	0,8	0,7	0,8	0,7	0,9	0,0	0,0
14		Heptadecanal	-	30.211	1899	1,5	0,6	0,5	0,2	0,5	0,3	0,5	2,3	1,5	4,5	0,5	2,0	1,3	3,4
15		1-Pentadecene	-	18.901	1502	1,6	0,6	0,7	0,5	0,8	0,0	0,6	2,7	2,6	ND	ND	3,5	1,7	4,8
16		Heptadecane	-	23.579	1711	1,1	0,6	0,6	0,4	0,5	0,3	0,5	1,1	0,9	2,2	0,3	1,1	0,6	1,5
17		Tetradecanal	Fatty, waxy, amber, incense, dry, citrus, peel, musk ²	30.220	1601	1,1	0,4	0,6	0,3	0,4	0,3	0,3	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
18		Tridecanal	Fresh clean, aldehydic, soapy ²	32.048	1502	1,4	0,5	0,7	0,3	0,5	0,4	0,7	1,8	1,5	3,5	1,4	2,8	2,4	3,7
19		Nonadecane	Bland ²	26.027	1910	1,6	2,1	3,0	0,9	1,9	1,0	2,1	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
		Total				11,2	7,0	8,4	3,9	6,8	3,9	6,6	10,2	8,5	16,5	3,1	11,8	6,9	16,0
Alkanes																			
20		Nonacosane		34.739	2904	0,4	0,2	0,0	0,1	0,2	ND	0,3	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
21		Eicosane	Waxy ²	37.523	2009	0,4	0,2	0,1	0,1	0,2	ND	0,2	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
22		2-Methylhexacosane	-	38.820	2442	0,0	0,1	0,0	0,1	0,2	ND	0,2	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
23		Pentacosane	-	36.179	2506	0,0	0,0	0,0	0,4	0,6	0,3	0,4	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
		Total				0,8	0,5	0,1	0,7	1,2	0,4	1,1	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Ketones																			
24		1-cyclododecyl-ethanone		37.002	1735	1,3	0,3	0,3	0,0	0,2	0,0	0,5	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
25		2-Pentadecanone	Floral, fresh jasmin, celery, fatty oily, waxy, burnt ^{2,4}	30.108	1648	2,5	0,8	0,9	0,4	0,7	0,5	1,3	8,5	4,3	6,1	6,5	6,6	4,3	7,9
26		4-Heptadecanone	-	24.244	1847	ND	ND	ND	ND	ND	ND	0,4	4,4	5,4	4,4	5,0	4,5	4,7	9,3
27		4-Dodecanone	-	28.848	1350	0,4	ND	ND	ND	ND	ND	0,7	1,6	1,5	0,0	1,7	1,4	1,2	2,8
28		11-methyl-4-dodecanone	-	24.217	1385	0,0	ND	ND	ND	ND	ND	0,0	1,6	1,7	0,0	1,5	1,5	1,0	1,7
29		4-Hexadecanone	-	32.531	1748	1,8	0,1	ND	ND	ND	ND	1,5	7,6	9,2	6,2	8,1	7,2	8,7	15,8
30		2-Nonadecanone	-	36.729	2046	1,0	0,2	0,3	0,1	0,1	0,1	0,4	ND	ND	ND	0,6	1,0	0,9	1,2
31		8-Pentadecanone	-	38.371	1648	0,5	ND	ND	ND	ND	ND	0,5	ND	ND	ND	0,8	ND	ND	ND
32		8-Octadecanone	-	41.001	1946	1,7	ND	ND	ND	ND	ND	0,8	ND	ND	ND	1,4	ND	ND	ND
33		12-Tricosanone	-	46.224	2443	1,2	ND	ND	ND	ND	ND	0,8	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
34		2-Undecanone	Fruity, waxy, creamy, fatty, orris, floral ^{2,4}	20.147	1251	1,0	ND	ND	0,5	0,8	0,5	0,9	2,4	ND	ND	2,7	2,0	1,4	3,5
35		10-Nonadecanone	-	43.405	2046	1,6	0,3	ND	ND	ND	0,1	0,5	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND

36	6,10,14-trimethyl-2-Pentadecanone	Floral, herbal, jasmin, celey, woody ²	31.942	1648	0,4	0,1	0,1	ND	ND	0,0	0,2	ND	ND	ND	ND	ND	ND		
37	2-Tridecanone	Waxy, fatty, dairy, milky, coconut, nutty, herbal, earthy ²	25.824	1449	0,9	0,0	0,5	0,4	0,6	0,5	0,9	3,2	1,6	2,3	2,8	2,5	1,5	3,0	
38	6-Pentadecanone	-	28.686	1648	ND	ND	ND	ND	ND	ND	0,2	ND	ND	ND	0,6	ND	ND	ND	
39	14-Heptacosanone	-	50.221	2841	ND	ND	ND	ND	ND	0,2	1,0	ND	ND	ND	1,3	ND	3,4	0,0	
40	6-Tridecanone	-	24.030	1449	ND	0,2	ND	ND	ND										
41	6-Dodecanone	-	32.373	1350	ND	1,0	ND	0,4	ND	0,5	ND								
42	Cyclopentadecanone	Musk, powdery musk, animal, greasy ²	36.989	1970	ND	2,1	1,6	ND	0,9	ND	ND	ND							
	Total				14,2	1,7	2,5	1,4	2,4	1,9	10,6	31,4	26,2	19,0	35,5	26,8	27,6	45,3	
Ester																			
43	Propionic acid, phenethyl ester	Floral rore, red rose, honey, fruity, balsamic storax ²	27.106	1359	ND	0,6	0,7	0,6	ND	ND	0,3	ND	ND	ND	1,2	ND	ND	ND	
44	Phenethyl acetate	Floral, rose, Sweet honey, fruity tropical ²	25.520	1259	4,8	26,3	24,1	29,7	9,5	17,0	11,9	10,0	10,7	18,6	5,6	9,8	5,8	11,4	
45	Caprylic acid, ethyl ester	Fuity, winey, waxy, Sweet, brandy ²	15.060	1183	ND	ND	0,9	0,9	1,5	1,1	1,5	ND	ND	ND	0,6	ND	ND	ND	
46	Stearic acid, allyl ester	-	35.883	2266	ND	ND	ND	ND	ND	ND	0,3	ND	ND	ND	0,6	ND	ND	ND	
47	4-Decenoic acid, ethyl ester, (Z)-	Fruity ²	22.593	1389	ND	ND	0,1	0,2	0,2	0,1	0,2	ND							
48	9-Hexadecenoic acid, ethyl ester	Floral, fatty, and spice-like ³	31.123	1986	ND	ND	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	ND							
49	Palmitic acid, ethyl ester	Waxy, fruity, creamy, milky, greasy, oily ²	33.908	1978	0,3	0,2	0,2	0,1	0,1	0,1	0,2	ND	ND	ND	3,8	1,5	1,0	2,2	
50	Hexanoic acid, 1,1-dimethylpropyl ester	-	25.169	1218	4,1	0,3	0,3	0,2	0,2	0,2	1,9	10,3	7,9	7,6	7,9	8,2	8,9	13,9	
51	Undecanoic acid, ethyl ester	Soapy, waxy, fatty, cognac, coconut ²	21.234	1481	0,0	0,9	1,7	2,4	2,6	1,5	1,3	ND	ND	ND	0,8	1,6	1,1	1,8	
52	Stearic acid, ethyl ester	Waxy ²	26.526	1381	0,2	0,3	0,6	0,6	0,6	0,5	0,5	ND							
53	Myristic acid, ethyl ester	Sweet, waxy, violet, orris ²	30.545	1779	ND	0,2	0,4	0,3	0,4	0,4	0,3	ND	ND	ND	1,3	1,3	0,9	1,9	
54	Octanoic acid, 3-methylbutyl ester	Sweet, oily, fruity, green, soapy, pineapple, coconut ²	21.936	1417	ND	0,6	0,7	0,6	ND	ND	0,3	ND							
55	Pentadecanoic acid, 3-methylbutyl ester	Waxy, banana, fruity, Sweet, cognac, green ²	27.031	1615	ND	ND	ND	0,3	0,5	0,5	0,3	ND							
56	Stearic acid, propyl ester	-	38.060	2276	ND	ND	ND	ND	0,3	0,3	0,4	ND	ND	ND	1,1	ND	ND	ND	
57	Hexadecanoic acid, propyl ester	-	35.205	1978	ND	3,8	1,5	1,0	2,2										
58	Oleic acid, methyl ester	Mild fatty ²	36.635	2085	ND	1,9	0,7	ND	ND										
59	Linoleic acid, ethyl ester	Mild fatty, fruity, oily ²	37.750	2193	ND	0,2	ND	ND	ND										
60	Isoamyl laurate	Winey, alcoholic, fatty, creamy, yeasty, fusel ²	30.939	1814	ND	0,3	ND	ND	ND										
61	Phenethyl butyrate	Musty, Sweet, floral, yeast, strawberry ²	27.000	1458	ND	1,5	ND	ND	ND										
	Total				9,4	29,4	29,8	36,1	16,1	21,7	19,4	20,3	18,6	26,2	30,5	24,6	18,6	33,5	
Others																			
62	2H-Pyran-2-one,	Fresh, Sweet, oily, coconut, fruity, peach, creamy, dairy ²	33.480	1404	0,4	0,3	0,4	0,4	0,7	0,5	0,4	ND	ND	ND	0,7	ND	ND	ND	
63	5-heptyldihydro-2(3H)-Furanone,	Fruity, peach, creamy, fatty, lactonic, apricot, ketonic, coconut ²	36.040	1284	ND	ND	ND	ND	0,2	0,2	0,3	ND	ND	ND	0,6	ND	ND	ND	
64	6-heptyltetrahydro-2H-Pyran-2-one	-	36.991	1602	ND	ND	ND	ND	0,2	0,2	0,2	ND	ND	ND	1,1	ND	ND	ND	
65	Butylated Hydroxytoluene	Phenolic camphoreous ²	27.604	1668	0,6	0,4	0,4	0,2	0,3	0,2	0,3	ND	ND	ND	0,0	ND	ND	ND	
66	Total				1,1	0,6	0,8	0,6	1,5	1,2	1,3	ND	ND	ND	2,4	ND	ND	ND	

¹ND means that the compound was not detected. ²(THE GOOD SCENTS COMPANY, [S.d.]). ³(HONG e colab., 2012). ⁴(MORAN e colab., 2022). ⁵(CHEN e colab., 2011). ⁶(KILCAWLEY, 2017)

Table S6. Volatile compounds (%) determined by HS-SPME/GC-MS in minas artisanal cheese produced on different farms in the Canastra microregion ripened for 30 days inoculated with *Listeria monocytogenes* ATCC19117.¹

No.	Class	Volatile compounds	Odor descriptors	Retention Time	Retention Index	Bambui							Tapirai						
						0	5	10	15	20	25	30	0	5	10	15	20	25	30
FFA/Acids																			
1		9-Octadecenoic acid	Fatty, waxy, lard, fried ²	38.306	2175	ND	ND	ND	ND	ND	ND	0,53	ND	ND	ND	ND	ND	ND	
2		Hexadecanoic acid	Waxy fatty ²	42.672	1968	1,20	0,64	0,35	0,92	7,75	6,04	0,92	ND	ND	1,73	0,81	0,00	1,12	2,12
3		Octanoic acid	Fatty, rancid, oily, vegetable, cheesy ²	30.754	1183	ND	ND	ND	ND	ND	ND	0,55	ND	ND	ND	ND	ND	ND	
4		Isobutyric anhydride	Unpleasant, parmesan cheese, acidic, sweaty, sour fruit, apple peel, rancid, sharp, pungent aroma characters ³	19.435	992	17,69	5,71	ND	ND	ND	ND	17,20	36,23	27,12	23,27	25,88	22,69	33,87	26,64
		Total				18,89	6,35	0,35	0,92	7,75	6,04	19,20	36,23	27,12	25,00	26,69	22,69	34,99	28,76
Alcohols																			
5		2-hexyl-1-decanol	citrus, sweet, fatty, waxy and woody ⁴	27.477	1790	3,87	2,00	1,32	1,46	6,44	6,64	4,44	ND	ND	ND	0,71	1,70	0,89	1,79
6		3-(methylthio)-1-propanol	Sulfurous onion sweet, soup vegetable ²	38.639	912	ND	0,32	0,74	0,64	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
7		3,7,11,15-tetramethyl-1-hexadecanol	-	37.695	1996	ND	ND	ND	ND	ND	ND	1,97	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
8		1-Pentadecanol	-	15.063	1755	0,42	0,20	0,13	0,26	ND	ND	0,16	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
9		Phenylethyl Alcohol	Floral rose, rose dried, honey, spice ^{2,5}	30.115	1136	28,85	57,91	63,01	66,33	36,97	36,57	10,98	0,00	6,73	8,58	1,75	3,44	ND	ND
		Total				33,13	60,42	65,20	68,69	43,41	43,21	17,55	0,00	6,73	8,58	2,46	5,15	0,89	1,79
Aldehydes																			
10		1-Heptadecene	-	25.521	1701	0,68	0,45	0,38	0,47	4,39	5,43	0,25	2,03	2,48	2,69	0,54	1,43	0,64	3,19
11		1-Pentadecene	Unpleasant ⁶	18.925	1502	1,01	0,87	0,72	0,73	7,49	12,43	0,00	4,47	4,97	4,92	1,12	3,12	1,44	4,98
12		3,7,11,15-tetramethyl-2-Hexadecene	-	27.608	1802	1,93	1,10	0,69	0,86	2,31	2,15	3,97	0,68	0,84	1,24	0,43	0,73	0,36	0,93
13		Heptadecanal	-	31.134	1899	0,92	0,56	0,39	0,27	6,34	6,49	0,36	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
14		Heptadecane	Fuel-like ⁷	23.615	1711	1,50	0,76	0,61	0,71	3,46	3,27	0,87	1,29	1,10	1,89	0,40	0,87	0,50	1,50
15		Octadecanal	Fatty, oily, Unpleasant ^{2,8}	34.772	1999	1,14	0,79	0,47	0,46	3,71	3,65	2,33	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
16		Tetradecanal	Wet wood, marine, plastic ⁹	30.215	1601	0,75	0,69	0,50	0,38	5,59	6,60	0,29	1,31	2,13	2,51	0,82	1,62	0,60	2,46
17		Tridecanal	Fresh clean, aldehydic, soapy ²	32.049	1502	1,14	0,79	0,47	0,46	3,71	3,65	2,33	2,30	2,33	2,27	1,40	2,75	1,81	3,55
		Total				9,07	6,01	4,24	4,35	37,00	43,67	10,40	12,08	13,87	15,52	4,70	10,51	5,36	16,61
Ketones																			
18		10-Nonadecanone	-	16.845	2046	1,37	0,61	ND	0,34	ND	ND	ND	ND	ND	ND	1,25	ND	0,69	ND
19		11-methyl-4-Dodecanone	-	24.221	1385	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	2,19	ND	ND	1,27	1,33	1,76	1,16
20		14-Heptacosanone	-	46.240	2841	1,13	0,50	ND	0,28	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
21		2-Nonadecanone	-	36.743	2046	0,96	0,45	0,25	0,00	3,12	0,00	0,21	ND	ND	ND	0,82	0,95	0,74	1,29
22		2-Pentadecanone	Floral, fresh jasmin, celery, fatty oily, waxy, burnt ^{2,10}	30.226	1648	2,63	1,21	0,58	0,60	4,05	4,84	6,38	7,29	4,84	4,94	6,12	6,04	4,28	7,05
23		2-Tridecanone	Waxy, fatty, dairy, milky, coconut, nutty, herbal, earthy ²	25.836	1449	1,05	0,55	0,49	0,57	ND	ND	2,90	2,67	1,76	2,16	2,54	2,25	2,46	3,19
24		2-Undecanone	Fruity, waxy, creamy, fatty, orris, floral ^{2,10}	22.597	1251	1,44	ND	ND	0,78	ND	ND	2,08	0,00	1,51	0,00	1,86	2,14	1,32	5,87
25		4-Dodecanone	-	28.851	1385	0,58	ND	ND	ND	ND	ND	0,72	2,16	1,32	0,94	1,67	1,58	1,14	1,95
26		4-Heptadecanone	-	24.239	1847	0,21	ND	ND	ND	ND	ND	0,73	7,31	5,20	4,20	4,65	5,22	4,30	6,16
27		4-Hexadecanone	-	32.545	1748	2,95	0,87	ND	ND	ND	ND	1,86	10,07	8,84	6,92	8,99	8,33	11,16	10,15
28		6-Hexadecanone	-	35.577	1748	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	1,54	1,20	1,48	1,54	1,36	1,24	1,72
29		6-Pentadecanone	-	28.770	1350	ND	ND	ND	ND	ND	ND	0,16	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
30		6,10,14-trimethyl-2-Pentadecanone	Floral, herbal, jasmin, celery, woody ²	21.240	1648	0,30	0,18	ND	ND	ND	ND	0,00	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
31		8-Octadecanone	-	41.016	1946	1,38	0,66	0,47	ND	ND	ND	0,33	ND	ND	ND	1,50	ND	1,09	ND
32		8-Pentadecanone	-	38.386	1648	0,61	0,23	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	0,63	ND	0,45	ND
33		Ethyl 9-hexadecenoate	-	31.135	1986	ND	ND	0,14	0,14	ND	ND	0,52	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
		Total				14,64	5,26	1,94	2,71	7,18	4,84	15,89	33,22	24,68	20,63	32,83	29,21	30,62	38,54
Ester																			
34		1-cyclododecyl-ethanone	-	37.007	1735	1,24	0,67	0,39	ND	ND	ND	0,78	ND	ND	ND	1,02	1,42	0,84	ND
35		(E)-9-Octadecenoic acid, ethyl ester	Fruity, flower ¹¹	33.483	2185	ND	ND	0,14	0,14	ND	ND	0,52	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
36		2-Phenylethyl propanoate	Floral, rose, red rose, fruity, honey, balsamic, storax ²	27.086	1359	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	1,34	1,14	1,23	1,05	ND	ND

37	Trielaidin	Milk, fatty ¹²	44.984	6149	ND	ND	ND	2,12	ND	ND	ND	ND	ND	ND	0,57	ND	1,09	ND	
38	Capric acid ethyl ester	Waxy, fruity, sweet, apple ²	30.558	1381	ND	ND	0,42	0,99	1,28	ND	ND	1,59	ND	ND	ND	0,80	3,24	1,63	6,97
39	Caprylic acid ethyl ester	Fuity, winey, waxy, Sweet, brandy ²	36.185	1183	ND	ND	1,11	1,92	ND	ND	1,79	ND	ND						
40	Elaidic acid methyl ester	-	38.077	2185	ND	ND	ND	ND	ND	ND	0,36	ND	ND						
41	Ethyl trans-4-decenoate	Green, fruity, wazy, cognac ²	22.601	1389	ND	ND	0,22	0,35	ND	ND	0,16	ND	ND						
42	Hexanedioic acid, bis(2-ethylhexyl) ester	-	41.782	2414	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
43	Hexanoic acid, 1,1-dimethylpropyl ester	-	25.173	1197	7,86	3,15	3,70	1,35	ND	ND	0,34	ND	ND						
44	Hexanoic acid, 2-methylbutyl ester	Ethereal ²	29.180	1218	5,78	2,45	0,91	ND	ND	ND	4,30	9,90	8,11	7,84	8,27	8,20	10,46	9,74	
45	Isoamyl laurate	Winey, alcoholic, fatty, creamy, yeasty, fusel ²	30.953	1814	ND	ND	ND	ND	ND	ND	0,78	ND	ND						
46	Lauric acid ethyl ester	Waxy, Sweet waxy, floral, soapy, clean ²	26.533	1580	ND	0,42	0,99	1,28	ND	ND	1,59	ND	ND						
47	Linoleic acid ethyl ester	Mild fatty, fruity, oily ²	37.769	2193	ND	ND	ND	ND	ND	ND	0,62	ND	ND						
48	Myristic acid ethyl ester	Sweet, waxy, violet, orris ²	30.545	1779	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	1,05	1,94	1,18	3,25	
49	Octadecanoic acid, 2-hydroxy-1,3-propanediyl ester	-	39.320	2694	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	2,53	1,81	4,33	3,03	2,70	3,45	3,11	
50	Oleic acid, ethyl ester	Mild fatty ²	37.136	2185	ND	ND	ND	ND	ND	ND	4,15	ND	ND	1,30	0,85	1,31	2,73	1,69	
51	Palmitic acid ethyl ester	Waxy, fruity, creamy, milky, greasy, oily ²	33.925	1978	ND	0,12	0,16	0,27	ND	ND	6,00	ND	ND	ND	1,99	1,99	1,43	3,36	
52	Propyl palmitate	-	35.224	2077	ND	ND	ND	ND	ND	ND	1,81	ND	ND	ND	1,31	ND	ND	ND	
53	Pentadecanoic acid, 3-methylbutyl ester	Waxy, banana, fruity, sweet, cognac, green ¹³	27.039	1615	ND	ND	ND	ND	ND	ND	0,93	ND							
54	Phenethyl acetate	Floral, rose, Sweet honey, fruity tropical ²	26.027	1259	6,01	11,44	15,15	7,42	4,67	2,25	1,60	6,03	16,34	15,65	6,23	10,61	2,46	7,34	
55	Stearic acid, allyl ester	-	35.884	2266	0,35	0,19	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	0,48	ND	0,42	ND	
56	Undecanoic acid, ethyl ester	Soapy, waxy, fatty, cognac, coconut ²	23.405	1481	0,00	1,12	3,17	4,84	ND	ND	2,43	ND							
	Total				21,24	19,97	26,91	20,97	4,67	2,25	29,75	18,46	27,60	30,26	26,84	32,44	25,67	35,47	
Others																			
57	5-heptyldihydro-2(3H)-Furanone	Fruity, peach, creamy, fatty, lactonic, apricot ²	36.037	1483	ND	ND	ND	ND	ND	ND	1,59	ND	ND						
58	6-heptyltetrahydro-2H-Pyran-2-one	Oily-fruity ¹⁴	36.965	1602	ND	ND	ND	ND	ND	ND	0,00	ND	ND	ND	0,97	ND	ND	ND	ND
59	Tetrahydro-6-Pentyl-2H-Pyran-2-one,	Coconut, fresh, Sweet, oily, fruity, peach, creamy, dairy ²	33.445	1404	ND	ND	ND	ND	ND	ND	0,00	ND	ND	ND	0,73	ND	ND	ND	ND
60	Tetrahydro-6-Tridecyl-2H-Pyran-2-one	Fatty, waxy, savory ²	40.122	2199	ND	ND	ND	ND	ND	ND	2,17	ND	ND						
61	Benzothiazole	Sulfurous, rubbery, vegetable, cooked, nutty, coffe, meaty ²	28.788	1208	1,49	0,86	0,50	0,77	ND	ND	0,00	ND	ND						
62	Butylated Hydroxytoluene	Phenolic ²	27.853	1668	0,89	0,54	0,41	0,59	ND	ND	0,42	ND	ND						
63	Squalene	Floral ²	38.237	2914	ND	ND	ND	ND	ND	ND	0,72	ND	ND						
	Total				2,38	1,40	0,91	1,36	ND	ND	4,90	ND	ND	ND	1,70	ND	ND	ND	ND

¹ND means that the compound was not detected. ²(THE GOOD SCENTS COMPANY, [S.d.]). ³(HONG e colab., 2012). ⁴(FENG e colab., 2021). ⁵(CHEN e colab., 2011). ⁶(VILLAVERDE e colab., 2007). ⁷(SASANAM e colab., 2022). ⁸(LI e colab., 2013). ⁹(VARLET e colab., 2006). ¹⁰(MORAN e colab., 2022). ¹¹(LU e colab., 2021). ¹²(DEMAN e DEMAN, 1983). ¹³(PRAIA e colab., 2022). ¹⁴(LASEKAN e ABBAS, 2010)